

PHOSPHORYLIERUNG DES ( $P^i$ )  
HOLOTROPONINKOMPLEXES AUS  
KANINCHENSKELETTMUSKEL MIT  
PHOSPHORYLASEKINASE.  
IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG  
DER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN.

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Abteilung für Biologie  
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von  
KORNELIA JAQUET  
aus Hagen

1983







Phosphorylierung des ( $P^1$ ) Holotropoinkomplexes aus  
Kaninchenskelettmuskel mit Phosphorylasekinase.  
Identifizierung und Charakterisierung der Phosphory-  
lierungsstellen.

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Abteilung für Biologie  
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von  
Kornelia Jaquet  
aus Hagen



1. Gutachter: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer
2. Gutachter: *Prof. Hengstenberg*
3. Gutachter: *Prof. Lüttgau*

Tag der mündlichen Prüfung: *26. 1. 83*

## Danksagung

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit danke ich  
besonders

Herrn Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer Jr. für die Überlassung des Themas,  
für die Anleitung und Betreuung

Herrn Prof. Dr. Hengstenberg für die Übernahme des Korreferates

Herrn Dr. Kiltz für die Beratung bei der Isolation und Reinigung der  
Peptide

Frau Dr. Varsanyi für die Gabe von Phosphorylasekinase und  
Phosphorylase a

Herrn Korte für die wertvolle technische Hilfe.



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                            | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                              | 1     |
| 2. Material und Methoden                                                                   | 7     |
| 2.1 Präparative Methoden                                                                   | 7     |
| 2.1.1 Herstellung der Casein-Sepharose                                                     | 7     |
| 2.1.2 Herstellung des Troponins aus Kaninchenskelettmuskel                                 | 7     |
| 2.1.3 Herstellung von ATP- $\gamma$ - <sup>32</sup> P                                      | 10    |
| 2.1.4 Herstellung von ADP-freiem ATP- $\gamma$ -S                                          | 10    |
| 2.1.5 Herstellung von ATP- $\gamma$ - <sup>35</sup> S                                      | 11    |
| 2.1.6 Herstellung der Phosphorylasekinase aus Kaninchenskelettmuskel                       | 12    |
| 2.1.7 Herstellung von Phosphorylase b                                                      | 13    |
| 2.1.8 Herstellung von AMP-freier Phosphorylase b                                           | 14    |
| 2.1.9 Herstellung von Phosphorylase a- <sup>32</sup> P                                     | 14    |
| 2.2 Analytische Methoden                                                                   | 16    |
| 2.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS                                 | 16    |
| 2.2.1.1 Das Verfahren nach Weber und Osborn                                                | 16    |
| 2.2.1.2 Das Verfahren nach Cohen                                                           | 17    |
| 2.2.2 Quantitative Auswertung von Rundgelen                                                | 17    |
| 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration                                                  | 17    |
| 2.2.3.1 Vorbereitung der Probe                                                             | 17    |
| 2.2.3.2 Proteinbestimmung im Technicon-Autoanalyzer                                        | 18    |
| 2.2.4 Bestimmung von Phosphat                                                              | 18    |
| 2.2.5 Bestimmung von Glucose-6-Phosphat und ATP                                            | 19    |
| 2.2.6 Enzymatische Bestimmung von ADP                                                      | 20    |
| 2.2.7 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten mithilfe der analytischen Ultrazentrifuge | 20    |
| 2.2.8 Reinigung von Harnstoff für die isoelektrische Fokussierung                          | 21    |
| 2.2.9 Isoelektrische Fokussierung im Sucrosegradienten                                     | 22    |
| 2.2.10 Aktivitätstest des ATP- $\gamma$ - <sup>35</sup> S                                  | 23    |

|                                                                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.2.11 Aktivitätstest der Phosphorylase                                                                     | 24    |
| 2.2.12 Einbau von $^{32}\text{P}$ bzw. $^{35}\text{S}$ in Protein                                           | 24    |
| 2.2.13 Angaben zur Radioaktivitätsmessung                                                                   | 25    |
| 2.2.14 Lokalisation des $^{32}\text{P}$ -Einbaus in das Troponin                                            | 26    |
| 2.2.14.1 Lokalisation mithilfe der SDS-Gelelektrophorese und Radioaktivitätsmessung im Scintillationszähler | 26    |
| 2.2.14.2 Lokalisation von radioaktiven Substanzen auf Dünnschichtplatten mithilfe des Dünnschichtscanners   | 26    |
| 2.2.14.3 Lokalisation von radiaktiven Substanzen mithilfe der Autoradiographie                              | 27    |
| 2.2.15 Dünnschichtchromatographische Methoden                                                               | 27    |
| 2.2.15.1 Zur Identifizierung von Peptiden                                                                   | 27    |
| 2.2.15.2 Zur Bestimmung von ATP, ADP und ATP- $\gamma$ -S                                                   | 28    |
| 2.2.16 Entfernen von SDS aus Proteinlösungen durch Ätherextraktion                                          | 29    |
| 2.2.17 Tryptische Spaltung von $^{32}\text{P}$ -markiertem Troponin                                         | 30    |
| 2.2.18 Isolierung und Reinigung der $^{32}\text{P}$ -Peptide des Troponins                                  | 31    |
| 2.2.18.1 Säulenchromatographie über Sephadex-G-25                                                           | 31    |
| 2.2.18.2 HPLC über eine halbpräparative "reversed-phase"-Säule                                              | 31    |
| 2.2.18.3 HPLC über eine analytische "reversed phase"-Säule                                                  | 32    |
| 2.2.19 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der radioaktiven Peptide                                    | 32    |
| 2.2.19.1 Probenvorbereitung (Hydrolyse)                                                                     | 32    |
| 2.2.19.2 Aminosäureanalyse mithilfe der Ninhydrinreaktion                                                   | 33    |
| 2.2.19.3 Aminosäureanalyse mithilfe der OPA-Reaktion über HPLC                                              | 33    |
| 3. Ergebnisse                                                                                               | 35    |
| 3.1 Phosphorylierung von Skelettmuskeltroponin mit calciumabhängiger Phosphorylasekinase                    | 35    |

|       | Seite                                                                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.2   | Nachweise von Proteinphosphataseaktivität 38                                                                   |
| 3.2.1 | Nachweis der Troponindephosphorylierung 38                                                                     |
| 3.2.2 | Thiophosphorylierung von Troponin 41                                                                           |
| 3.3.  | Versuch zur Entfernung der Proteinphosphatasen durch Affinitätschromatographie an Blauer Sepharose 44          |
| 3.4   | Reinigung des $^{32}\text{P}$ -markierten ( $\text{P}^1$ )-Troponins 53                                        |
| 3.4.1 | Abtrennung der Phosphorylasekinase vom $^{32}\text{P}$ -markierten ( $\text{P}^1$ )-Troponin 53                |
| 3.4.2 | Präparative isoelektrische Fokussierung von radioaktiv markiertem Troponin T 59                                |
| 3.5   | Enzymatische Verdauung des $^{32}\text{P}$ -Troponin T 62                                                      |
| 3.6   | Isolierung und Reinigung der $^{32}\text{P}$ -markierten Peptide des ( $\text{P}^1$ )-Troponins 67             |
| 3.6.1 | Gelfiltration über Sephadex G-25 67                                                                            |
| 3.6.2 | Hochdruckflüssigkeitschromatographie über eine "reversed phase"-Säule (RP-18) 70                               |
| 3.7   | Aminosäureanalyse der Phosphopeptide 73                                                                        |
| 3.7.1 | Anmerkung zur Aminosäurebestimmung mit o-Phthalaldehyd 73                                                      |
| 3.7.2 | Aminosäurezusammensetzung der Peptide 79                                                                       |
| 3.8   | Bestimmung der Phosphorylierungskinetik für die beiden Phosphorylierungsseiten im ( $\text{P}^1$ )-Troponin 84 |
| 4.    | Diskussion 88                                                                                                  |
| 5.    | Zusammenfassung 98                                                                                             |
| 6.    | Abkürzungen 99                                                                                                 |
| 7.    | Literaturverzeichnis 100                                                                                       |



## 1. Einleitung

Troponin und Tropomyosin sind Regulatorproteine für die Muskelkontraktion, die zusammen mit Aktin das dünne Filament bilden (Elzinga et al., 1973).

Zwei Aktinstränge sind helical umeinandergeschlungen (Ebashi et al., 1969). In den dabei gebildeten Zwischenräumen ist der Troponin-Tropomyosin-komplex lokalisiert. Sieben Aktinmoleküle binden je ein Troponin- und ein Tropomyosinmolekül (Ebashi und Endo, 1968).

Troponin ist ein Heteropolymer, aufgebaut aus drei verschiedenen Untereinheiten:

- 1) dem Troponin I, der tropomyosinbindenden Untereinheit (Greaser und Gergely, 1971; Murray und Kay, 1971; Drabikowsky et al., 1972) mit einem Molekulargewicht von 30 500 (Pearlstone et al., 1977),
- 2) dem Troponin I, der inhibitorischen Komponente (Murray und Kay, 1971; Perry et al., 1972; Wilkinson et al., 1972) mit einem Molekulargewicht von 20 900 (Wilkinson und Grand, 1975).
- 3) dem Troponin C, der calciumbindenden Untereinheit (Hartshorne und Pyun, 1971; Greaser und Gergely, 1973; Potter und Gergely, 1974; McCubbin et al., 1974) mit einem Molekulargewicht von 17 900 (van Eerd und Takahashi, 1975).

Nach Ebashi et al., 1973; Greaser et al., 1973 und Potter, 1974 liegen die Untereinheiten in Myofibrillen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 vor. Im isolierten Troponin dagegen findet man ein anderes stöchiometrisches Verhältnis, nämlich T:I:C=1:2:1 (Sperling et al., 1979).

Das Signal für die Muskelkontraktion ist ein intrazellulärer Anstieg der Calcium-Ionenkonzentration, wobei das Troponin als Calciumakzeptor dient (Ebashi und Kodoma, 1965). Durch die Bindung des Calciums an das Troponin C wird eine Konformationsänderung der Troponin-C-Untereinheit ausgelöst (Onishi et al., 1975; Iio et al., 1976), wodurch wiederum eine Konformationsänderung des Troponin I und infolgedessen des Troponin T erreicht wird (Seamon et al., 1977). Die Konformationsänderungen im Troponin bewirken eine Lageverschiebung des Tropomyosins (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972; Parry und Squire, 1973; Wakabayashi et al., 1975; Seymour und O'Brien, 1980) (Abb. 1), wodurch Myosinbindestellen am Aktin freigegeben werden (Huxley, 1972). Die Myosin-Aktin-Wechselwirkung aktiviert die Myosin-ATPase, die durch Hydrolyse des ATP's die Energie für die Kontraktion liefert (Ebashi, 1961).

Außer dieser durch Calcium bewirkten Effekte, können die an der Regulation beteiligten Proteine, Troponin und Tropomyosin, phosphoryliert werden. Über den Mechanismus dieser Phosphorylierungsvorgänge, sowie über deren Funktion ist nur sehr wenig bekannt.

Im isolierten Skelettmuskeltroponin findet man nach der Präparation unter den üblichen Bedingungen endogen ein Mol Phosphat pro Mol Troponin. Dieses Phosphat ist an das N-terminale acetylierte Serin der Troponin T-Untereinheit gebunden (Pearlstone et al., 1976; Moir et al., 1977). Dieser Phosphatrest ist in dem umgebenden Medium frei rotierbar, d.h. er besitzt eine höhere Beweglichkeit als das Protein, an das er gebunden ist. (Sperling et al., 1979). Entsprechend spaltet alkalische Phosphatase diese Phosphoesterbindung wie die eines niedermolekularen Substrates (Sperling et al., 1979). Es wurde eine spezifische Troponin T-Kinase im Kaninchenskelettmuskel beschrieben, die den N-terminalen Serinrest

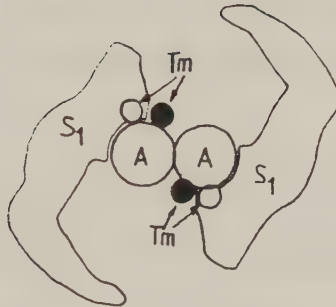


Abb. 1

Querschnitt durch das dünne Filament nach Huxley, 1972

A = Aktin

$S_1 = S_1$  - Untereinheit des Myosins

Tm = Tropomyosin

weiß: Position im ruhenden Muskel

schwarz: Position im aktiven Muskel

phosphoryliert (Dobrovol'skij et al., 1976; Gusev und Dobrovol'skij 1978; Kumon und Villar-Palasi, 1979). Über die Funktion dieses Phosphates ist noch nicht sehr viel bekannt. Nach Jahnke und Heilmeyer, 1980 und Heilmeyer et al., 1981 bestimmt dieses N-terminale Phosphat die Magnesiumaffinität des Troponin C und damit indirekt über die Kompetition der Magnesium- und Calciumbindung an der gleichen Bindungsstelle die Calciumaffinität.

Unter leicht veränderten Präparationsbedingungen läßt sich aus Kaninchenskelettmuskel ein Troponin mit zwei Mol Phosphat isolieren (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Es ist aber noch nicht geklärt, an welcher der drei Troponinuntereinheiten dieses zweite Phosphat gebunden ist.

In vitro lassen sich sowohl die Troponin T-Untereinheit - zusätzlich zum endogen vorhandenen Phosphat am N-Terminus - wie auch die Troponin-I-Untereinheit phosphorylieren. In welche der beiden Untereinheiten Phosphat eingebaut wird, ist abhängig von den verwendeten Proteinkinasen. CAMP-abhängige Proteinkinase erreicht nur die Phosphorylierungsseiten des Troponin I (Moir et al., 1974). Troponin T-Kinase aus Hundeherzen (Villar-Palasi und Kumon, 1981) phosphoryliert Troponin I und Troponin T. Die calmodulinabhängige Phosphorylasekinase dagegen, baut Phosphat bevorzugt in die Troponin T-Untereinheit ein (Perry und Cole, 1974).

In das aus dem Troponinkomplex isolierte Troponin T kann man zusätzlich zum endogenen Phosphat zwei Mol Phosphat in zwei verschiedene Seiten mit Phosphorylasekinase einbauen (Perry und Cole, 1974). Eine Phosphatgruppe wird an einen Serinrest in Position 148 oder 149, die zweite Phosphatgruppe an einen Serinrest in Position 156 oder 157 gebunden (Moir et al., 1977).

Durch Bildung eines Troponin T-Troponin C-Komplexes im Verhältnis 1:1 wird die Phosphorylierung dieser beiden zusätzlichen Seiten zu mindestens 70% gehemmt (Moir et al., 1974). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnte im isolierten Holotroponinkomplex, in dem ebenfalls ein Mol Troponin T und ein Mol Troponin C vorhanden ist, durch Phosphorylasekinase ein Mol Phosphat zusätzlich zum endogenen N-terminalen Phosphat in das Troponin T eingebaut werden (Sperling et al., 1979). Somit konnten die Beobachtungen von Moir et al., 1974, die am rekonstituierten Komplex gemacht wurden, am isolierten Holokomplex nicht bestätigt werden. Auffälligerweise erreicht man im Troponinkomplex niemals einen höheren Phosphatgehalt als zwei Mol Phosphat pro Mol Troponin T und nicht die maximal mögliche Anzahl von drei Mol Phosphat. Daraus ergeben sich mehrere Interpretationsmöglichkeiten:

1) Im  $P^{1-}$  Holotroponinkomplex sind durch die Bindung der T-Untereinheit an die I- und C-Untereinheit die Phosphorylierungsseiten verdeckt, die in der isolierten Untereinheit durch Phosphorylasekinase phosphorylierbar sind. Beachtet man die Spezifität der Phosphorylasekinase - sie benötigt ein bzw. zwei Aminosäurereste zur N-terminalen Seite des phosphorylierbaren Serins eine basische Aminosäure (Krebs et al., 1958) - kommt als alternative Phosphorylierungsseite laut Primärsequenz (Pearlstone et al., 1976) nur das Thr 248 oder 249 in betracht. Bei allen anderen Serinen oder Threoninen fehlt die für die Phosphorylasekinase notwendige Erkennungssequenz.

2) Möglicherweise kann nur eines der beiden obengenannten Serine phosphoryliert werden, und man erreicht deshalb nur den Einbau von zusätzlich ein Mol Phosphat pro Mol Troponin.

3) Eine weitere Alternative besteht darin, daß beide Serine im Holo-

troponinkomplex wie im isolierten Troponin T phosphoryliert werden. Der zusätzliche Einbau von einem Mol Phosphat pro Mol Troponin könnte einen Gleichgewichtszustand darstellen, der durch gleichzeitige Phosphorylierung und Dephosphorylierung hervorgerufen würde.

Aus diesen Überlegungen ergeben sich folgende Aufgaben:

- 1) die Phosphorylierungsseite(n) im Holotroponinkomplex zu definieren,
- 2) die Frage zu klären, warum nur ein Mol Phosphat zusätzlich zum endogen vorhandenen Phosphat in die T-Untereinheit eingebaut werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt werden, daß es im Troponin T - im Komplex mit den beiden anderen Untereinheiten - zwei phosphorylierbare Seitengibt. Die Phosphorylierung des Troponins zeigt einen mehrphasischen Zeitverlauf. Es konnten Proteinphosphatasen nachgewiesen werden, die phosphoryliertes Troponin dephosphorylieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Präparative Methoden

#### 2.1.1 Herstellung der Caseinsepharose nach Jennissen und Heilmeyer, 1975 und Dickneite, 1976

100 g trockengesaugte Sepharose 4B werden zur Aktivierung mit 96 ml 2.6 M Phosphatpuffer ( $1.8 \text{ M K}_3\text{PO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O} / \text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ ) pH 13 und 44 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und unter Rühren im Eisbad auf ca.  $5^\circ\text{C}$  gekühlt. Für die optimale Kopplung wird 18 mg BrCN für 5 mg Casein benötigt. Das BrCN wird in wasserfreiem Dioxan gelöst, wobei der Gehalt an Brom vorher iodometrisch bestimmt wurde. Die Bromcyanlösung wird nun zu der Sephadex 4 B-Suspension gegeben. Die Aktivierung nimmt etwa 12 min in Anspruch, wobei darauf geachtet werden muß, daß die Temperatur  $+10^\circ\text{C}$  nicht überschreitet. Nach 12 min wird die Suspension abgenutscht und sofort mit 5 l einer 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung pH 12.8 gewaschen und trockengesaugt. Die so aktivierte Sepharose wird zum Ankoppeln des Caseins in 100 ml Caseinlösung überführt (600 mg Casein/100 ml 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ ) und bei Raumtemperatur gerührt. Zur Verfolgung der Kopplung des Caseins an die Sepharose werden mit einer Einmalspritze durch ein Nylonsieb (Maschenweite:  $20\mu\text{m}$ ) Proben von 1 ml entnommen und auf den Proteingehalt getestet. Sinkt die Proteinkonzentration im Überstand unter 1 mg/ml, so ist die optimale Kopplung erreicht (Dauer ca. 2 Std.) (Abb. 2). Überschüssiges Protein wird durch Waschen mit 1.5 M NaCl pH 8.0 entfernt. Danach wird die Casein-Sepharose gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.2 Herstellung des Troponins nach Ebashi et al., 1971, modifiziert nach Sperling et al., 1979

Alle Präparationsschritte werden im Kühlraum bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. 1 kg

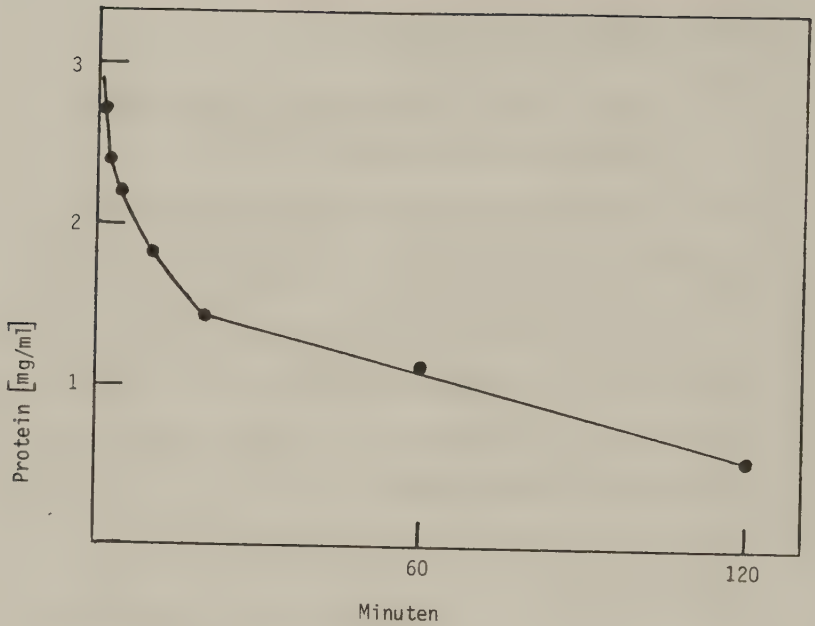


Abb. 2

Kopplung von Casein an Sepharose 4B

Mit einer Einmalspritze wurden durch ein Nylonsieb Proben von 1 ml aus dem Kopplungsansatz zu verschiedenen Zeiten entnommen und auf den Proteingehalt getestet.

Kaninchenskelettmuskel wird im Fleischwolf zerkleinert und mit 3 l Guba-Straub-Lösung ( $0.3 \text{ M KCl}$ ,  $0.1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4/0.05 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$ ) 30 min lang gerührt und anschließend bei 15 000 g 20 min in der Kühlzentrifuge (WKF) abzentrifugiert. Der Niederschlag wird ein zweites Mal mit Guba-Straub-Lösung verrührt und wie oben abzentrifugiert. Danach wird der Niederschlag wiederum in 2 l Guba-Straub-Lösung aufgenommen, 2 min gerührt und durch eine zweifache Lage Gaze ausgepreßt. Der Rückstand wird mit  $3 \text{ l } 2 \text{ mM KCl}/0.2 \text{ mM KHCO}_3$  versetzt, 10 min gerührt und durch die Gaze gepreßt. Danach wird der Rückstand zweimal mit je 2 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest 5 min gerührt und durch Gaze filtriert. Der so gewaschene Rückstand wird mit dem halben Volumen einer  $1.2 \text{ M LiCl}$ -Lösung aufgenommen, 5 min gerührt und bei 15 000 g 20 min abzentrifugiert. Daraufhin wird das Pellet mit dem gleichen Volumen einer  $0.4 \text{ M LiCl}$ -Lösung aufgenommen und im Eisbad ca. 120 min extrahiert. Dazu wird durch tropfenweise Zugabe  $1 \text{ N HCl}$  mithilfe des Autotitrators der pH-Wert auf 4.7 eingestellt. Ist der Endpunkt erreicht, wird die Suspension bei 15 000 g 20 min abzentrifugiert, das Pellet verworfen, der Überstand durch Glaswolle filtriert und der pH der Lösung mit kristallinem Natriumhydrogencarbonat auf pH 7.0 eingestellt. Anschließend wird diese Lösung mit kristallinem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $27.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ) versetzt, 10 min gerührt und wiederum bei 15 000 g 20 min in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird nun erneut über Glaswolle filtriert und mit kristallinem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $7.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ) versetzt, 10 min. gerührt und 20 min. bei 15 000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag (Rohtroponin) wird in  $0.6 \text{ M LiCl}$ -Lösung aufgenommen und mit gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung die Pufferkonzentration auf  $0.4 \text{ M LiCl}$  und  $33.3\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.1 eingestellt. Die Rohtroponin-Lösung wird nun über eine Casein-Sepharose-Säule ( $5.0 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ ) von Proteasen gereinigt. Die Elution des Troponins erfolgt mithilfe eines

absteigenden Ammonsulfatgradienten in 0.4 M LiCl von 33.3% - 0% - Sättigung. Das so gereinigte Troponin wird mit gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, mit 15 000 g 20 min abzentrifugiert, das Pellet in 10 mM Natriumhydrogencarbonat aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.1.3 Herstellung von ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ nach Glynn und Chappel, 1964

18.3 mg ATP-Dinatriumsalz (ca.  $39\mu\text{Mol}$ ) werden in ein Reagenzglas eingewogen. Folgende Lösungen werden hinzupipettiert:

0.5 ml 0.5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8.0); 2.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest, 0.023 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung; 0.5 ml 0.1 M NaOH; 0.1 ml Cysteinbase (12 mg/ml); 0.17 ml 3-Phosphoglycerat (16.2 mg/ml); 0.005 ml NAD (10 mg/ml); 3 ml  $^{32}\text{P}$ -Phosphat (Firma NEN: 10 mCi  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in 1 ml 0.01 N HCl, 0.2 ml 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1.8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest); 0.05 ml Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (10 mg/ml).

Diese Mischung wird für 60 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach werden 150 mg Aktivkohle (behandelt mit 0.1 N HCl und 0.1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) hinzugegeben, und die Suspension über eine mit Cellulose beschichtete Fritte filtriert. Nach dem Waschen mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest wird das an die Aktivkohle adsorbierte Nukleotid mit 45 ml 50% Äthanol / 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  eluiert, am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingeeengt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.1.4 Herstellung von ADP-freiem ATP- $\gamma$ -S nach Eckstein, 1977

Kommerziell erhältliches ATP- $\gamma$ -S enthält je nach Charge (bis zu 25%) ADP als Verunreinigung. Vor seiner weiteren Verwendung, wie z.B. für die Herstellung von ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ , muß das ADP entfernt werden. Hierzu werden 100 mg ATP- $\gamma$ -S in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest gelöst und auf eine DEAE-Sephadex A 25-Säule (1.5 cm x 20 cm) aufgetragen, die mit frisch hergestelltem 0.1 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat äquilibriert ist. (Eine 1 M Lösung von

frisch destilliertem Triäthylamin (Sdp. 89-91°C) wird bis zum Erreichen eines neutralen pH mit CO<sub>2</sub> durchspült und entsprechend verdünnt). Nach erneuter Äquilibrierung mit diesem Puffer wird mit 1 l eines linear von 0.1 - 0.6 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat ansteigenden Gradienten eluiert. Es werden drei bei 260 nm absorbierende Nukleotidpeaks beobachtet, die bei Triäthylammoniumhydrogencarbonatkonzentrationen von 0.22 M ( $\equiv$ ADP); 0.37 M ( $\equiv$ ATP, sehr geringe Mengen) und 0.42 M ( $\equiv$ ATP- $\gamma$ -S) eluiert werden.

Die ATP- $\gamma$ -S Fraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Anlegen eines Vakuums (ca. 2 mbar) bei 21°C eingedampft. Der ATP- $\gamma$ -S Rückstand wird mit je zweimal 400 ml Methanol gewaschen, um Verunreinigungen, die durch die Oxidation des Triäthylammoniumhydrogencarbonats entstanden sind, zu entfernen (Rotationsverdampfer mit Vakuum von ca. 20 mbar). Das ATP- $\gamma$ -S wird noch zweimal in 40 ml bzw. in 10 ml H<sub>2</sub>O bidest gelöst, jeweils am Rotationsverdampfer unter Vakuum (2 mbar) eingedampft, anschließend in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration des ATP- $\gamma$ -S wird UV-photometrisch bestimmt ( $\epsilon_{260} = 15 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ ).

### 2.1.5 Herstellung von ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S nach Eckstein, 1977

Ca. 7 mg kommerziell erhältliches <sup>35</sup>S-Trinatriumphosphat (20 mCi im Originalpräparateglas von NEN) werden durch Zugabe von 3.5 ml H<sub>2</sub>O bidest, 0.3 ml Tris/HCl pH 8.0, 0.15 ml 0.1 M DTE, 0.12 ml 3-Phosphoglycerat (50 mg/ml) und 0.4 ml gereinigtes 32 mM ATP- $\gamma$ -S gelöst. Nach Zusatz von 0.03 ml Gyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (10 mg/ml in 3.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und 0.075 ml Phosphoglyceratkinase (10 mg/ml in 3.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird 6 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das gebildete ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S wird aus dem Präparationsansatz durch DEAE-Sephadex-Chromatographie - wie unter 2.1.4 beschrieben - isoliert. Man erhält ein dünn-

schichtchromatographisch (PEI-Cellulose) einheitliches Produkt von ca. 5 mM ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  und einer spezifischen Radioaktivität von ca. 160 Ci/Mol.

#### 2.1.6 Herstellung der Phosphorylase-Kinase aus Kaninchenskelettmuskel nach Cohen, 1973 und Jennissen und Heilmeyer, 1975

4 kg Kaninchenfleisch werden im Fleischwolf zerkleinert und jeweils 1 kg mit 2.5 l 4 mM EDTA/10 mM Tris (nicht eingestellt) für 45 sec im Waring Blendor auf der höchsten Stufe homogenisiert. Das Homogenat wird 25 min. bei 13 000 g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand durch Glaswolle filtriert. Der pH-Wert des Filtrats beträgt ca. 6.7 und wird durch Zugabe von 1 N Essigsäure auf einen Wert von 5.9 - 6.1 gesenkt, so daß die Phosphorylasekinase ausfällt. Den Endpunkt der Säurefällung erkennt man daran, daß bei einer mit der gefällten Suspension gefüllten 20 ml Glaspipette, die Zahlen von der Rückseite der Pipette aus gerade nicht mehr sichtbar sind. Nach Zentrifugation dieser Suspension für 25 min bei 13 000 g wird der Überstand verworfen und der Niederschlag mit einem gleichen Volumen 100 ml GP, 4 mM EDTA (pH 8.0) neutralisiert. Anschließend wird die Suspension im Potter in maximal 300 ml 50 mM GP-HCl pH 7.0, 2 mM EDTA, 20 mM ME, 0.02%  $\text{NaN}_3$  homogenisiert und 100 min bei 100 000 g abzentrifugiert. Zum Überstand werden 52% des Volumens 3.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.0 hinzugefügt und nach 10 min (Standzeit im Eis) bei 12 000 g 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 30 ml 50 mM GP, 2 mM EDTA/20 mM ME, 0.02%  $\text{NaN}_3$  pH 7.0 aufgenommen und 1 Stunde gegen 1.5 l gleichen Puffers dialysiert. Im Anschluß an die Dialyse wird die Lösung zur weiteren Reinigung 25 min. bei 27 000 g zentrifugiert und dann auf die Sepharose 4B-Säule (10 cm x 27 cm) gegeben, die mit 50mM GP,

2 mM EDTA, 20 mM ME, 0.02%  $\text{NaN}_3$  (pH 7.0) äquilibriert worden ist.

Mit dem gleichen Puffer wird nach dem Auftragen eluiert. Von den drei bei 280 nm adsorbierenden Peaks werden die Fraktionen des mittleren Peaks gesammelt und auf eine mit gleichem Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose Säule (4 cm x 60 cm) gegeben. Die Elution erfolgt in einem linearen NaCl-Gradienten von 0-0.5 M (ca. 1.2 l) NaCl, gelöst in dem oben beschriebenen Puffer. Bei einer Konzentration von ca. 180 mM NaCl wird die Phosphorylasekinase eluiert, deren Reinheit durch SDS-PAGE überprüft wird. Die so auf Reinheit untersuchten Fraktionen werden in einer Amicon-Zelle über ein Diaflo XM-100 Ultrafilter bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml ankonzentriert und in 30% Glycerin bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.1.7 Herstellung von Phosphorylase b aus Kaninchen-Skelettmuskel nach Fischer und Krebs, 1958

3 kg Kaninchenskelettmuskeln werden im Fleischwolf zerkleinert und bei Raumtemperatur mit 3 Litern  $\text{H}_2\text{O}$  bidest 15 min extrahiert. Der Muskelbrei wird durch eine vierfache Lage Gaze ausgepreßt und der Extrakt auf Eis gestellt. Die Extraktion wird zweimal wiederholt: a) mit 3 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest für 10 min b) mit 1.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest für 5 min. Die weitere Präparation erfolgt im Kühlraum bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Die Extrakte werden vereinigt und 4 Stunden gegen 50 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest dialysiert. Der Rohextrakt wird im Anschluß an die Dialyse mit 1N Essigsäure auf einen pH-Wert von 5.25 - 5.35 eingestellt und der auftretende Niederschlag 20 min bei 15 000 g abzentrifugiert. Mit kristallinem Kaliumhydrogencarbonat wird der pH auf 6.8 eingestellt und mit 250 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter Extrakt versetzt (41% Sättigung). Der pH-Wert wird dabei mit konzentriertem Ammoniak neutral gehalten. Den Nieder-

schlag läßt man über Nacht absetzen, dekantiert den größten Teil des Überstandes ab, zentrifugiert die restliche Suspension für 25 min bei 15 000 g, und homogenisiert anschließend den Niederschlag mit 150 ml  $H_2O$  bidest. Das Homogenat wird 2 - 4 Stunden gegen 5 Liter  $H_2O$  bidest, dann über Nacht gegen 5 l 1 mM Tris/HCl pH 7.0 dialysiert. Zu der dialysierten Lösung werden 1/500 Volumen 15 M ME, verdünnt in 5 ml  $H_2O$  bidest und 1/400 Volumen 0.2 M EDTA pH 7.0 gegeben. Der pH-Wert wird mit 2 M Tris auf pH 8.8 eingestellt. Diese Lösung wird für 60 min bei 37°C inkubiert, auf 4°C abgekühlt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Der dabei auftretende Niederschlag wird 15 min bei 30 000 g abzentrifugiert, und der Überstand mit 1/100 seines Volumens an 1 M MgAc und 1/100 seines Volumens an 0.1 M AMP pH 7.0 versetzt. Man läßt die Phosphorylase b über Nachtauskristallisieren und kristallisiert danach noch zweimal um. Die kristalline Suspension wird bei 0°C aufbewahrt.

#### 2.1.8 Herstellung von AMP-freier Phosphorylase b nach Fischer und Krebs, 1958

20 ml der kristallinen Phosphorylase b (ca. 200 mg Protein) werden 15 min bei 30 000 g abzentrifugiert und in 5 - 10 ml 50 mM ME, 10 mM GP pH 7.0 bei 30°C gelöst. Die Lösung wird auf eine Aktivkohlesäule (1 g Aktivkohle äquilibriert mit 50 ml obigen Puffers) gegeben. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm wird bestimmt. Er sollte einen Wert von ungefähr 0.52 - 0.54 haben.

#### 2.1.9 Herstellung von Phosphorylase a- $^{32}P$ nach Krebs et al., 1958

Zu AMP-freier Phosphorylase b, die auf eine Konzentration von 25 mg/ml eingestellt wird, werden pro mg Phosphorylase 120 nM Magnesiumacetat,

40 nM ATP und  $1\mu\text{Ci ATP-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  zugesetzt. Der pH-Wert wird mit 2 M Tris auf pH 8.2 eingestellt. Nach 10 min Vorinkubation bei  $30^{\circ}\text{C}$  wird die Konvertierungsreaktion durch die Zugabe von  $3\mu\text{g}$  Phosphorylasekinase pro mg Phosphorylase b gestartet. Der Ansatz wird 30 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert und durch Abkühlen auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgestoppt. Nach 15 min hat sich ein Niederschlag gebildet, der 15 min bei 30 000 g abzentrifugiert wird. Der Niederschlag wird in 20 mM ME, 20 mM Tris/HCl pH 7.0 gelöst (ca. 20 mg/ml Phosphorylase). Durch Filtration über Aktivkohle, die mit dem obigen Puffer äquilibriert wurde, wird das ATP entfernt. Die Lösung wird auf Eis gestellt; die Phosphorylase a kristallisiert innerhalb 3 - 4 Stunden aus. Das Enzym wird noch zweimal umkristallisiert, und die kristalline Suspension wird im Eisbad aufbewahrt.

Für die Umkristallisierung wird die Kristallsuspension für 15 min bei 30 000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 20 mM ME, 10 mM Tris/HCl pH 7.0 (20 mg/ml Phosphorylase) aufgenommen. Eventuell auftretender Niederschlag denaturierten Proteins wird 15 min bei 30 000 g ( $22^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert.

## 2.2 Analytische Methoden

### 2.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS

#### 2.2.1.1 Das Verfahren nach Weber und Osborn, 1969

Die folgende Vorschrift ist berechnet auf eine Acrylamidkonzentration von 10%.

Stammlösungen für die Polyacrylamidgele:

- A 22,2% Acrylamid/0.6% Methylen-bis-Acrylamid
- B 57 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 145 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2% SDS
- C TEMED
- D 15 mg/ml Ammoniumperoxidisulfat

Für 12 Röhrchengele werden von der Lösung A 9 ml, der Lösung B 10 ml und der Lösung C 0.02 ml zusammengegeben und in der Saugflasche mithilfe der Wasserstrahlpumpe entgast. Zum Start der Polymerisation wird 1 ml der Lösung D hinzugegeben, gut durchmischt und das Lösungsgemisch in die Gelröhrchen pipettiert. Um eine gleichmäßige Geloberfläche zu erhalten, wird das Acrylamidgemisch mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest überschichtet. Die Polymerisationsreaktion ist nach ca. 4 Stunden abgeschlossen.

Die Proben (5 - 10  $\mu\text{g}$  Protein/Bande) werden mit 0.05 ml Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht und anschließend auf die Gele aufgetragen. Der Probenpuffer ist folgendermaßen zusammengesetzt: 28.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 72.25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1% SDS, 0.002% Bromophenolblau, 10% Glyzerin, 150 mM ME, pH 7.2.

Der Kammerpuffer besteht aus 28.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 72.25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% SDS.

Die Elektrophorese wird bei Stromstärken von 5-8 mA/Gel durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele aus den Gelröhrchen mithilfe einer auf die Röhrchen aufsetzbaren Glasspritze herausgeschoben.

Anschließend werden die Gele ca. 10 min in einer Färbelösung bei 60°C im Wasserbad gefärbt und schließlich bis auf die Proteinbanden wieder entfärbt. Färbelösung: 0.25% Coomassie-Brillant-Blue, 9% Essigsäure, 45% Methanol, 46% H<sub>2</sub>O bidest  
Entfärbelösung: 7.5% Essigsäure, 5% Methanol, 87.5% H<sub>2</sub>O bidest.

#### 2.2.1.2 Das Verfahren nach Cohen, 1973

Die Stammlösungen sind vergleichbar mit denen der Methode 2.2.1.1. Lösung B enthält eine andere SDS-Konzentration, nämlich 0.5% SDS. Für 12 10%ige Gele werden 13.5 ml der Lösung A, 6 ml der Lösung B, 30  $\mu$ l der Lösung C und 9 ml H<sub>2</sub>O bidest gemischt und wie unter 2.2.1.1 beschrieben, weiter behandelt.

Der Kammerpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

14.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% SDS.

Der Vorteil der Cohen-Methode liegt in der erheblich verkürzten Elektrophoresedauer.

#### 2.2.2 Quantitative Auswertung von Rundgelen

Zur Messung der relativen Proteinmengen der Banden auf den angefärbten Polyacrylamidgelen werden diese mit einem Zeiss Photometer PMQ II, der mit dem Densitometriegerät ZK4 ausgerüstet ist, der Länge nach photometriert.

#### 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al., 1951

##### 2.2.3.1 Vorbereitung der Probe

Bei störenden Substanzen in der Probelösung - wie z.B. ME, DTE usw. -

muß das Protein vor der Proteinbestimmung mit 10% TCA gefällt werden. Nach dem Abzentrifugieren (15 min in der Tischzentrifuge) wird das Pellet in 1% SDS, 0.1 N NaOH aufgenommen.

#### 2.2.3.2 Proteinbestimmung im Technicon-Autoanalyzer

Die Bestimmung erfolgt bei Raumtemperatur. Ein Aliquot der Probe wird mit dem gleichen Volumen 0.1%  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.24% Dinatriumtartrat  $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0 vermischt. In einem Abstand von jeweils 1 Minute erfolgt zunächst der Zusatz eines 4.25 fachen Volumens 0.2 N NaOH, 2.12%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und dann der Zusatz eines gleichen Volumens Folin-Ciocalteu Reagenz (1:4 mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest verdünnt).

Nach 5 min Inkubationszeit wird bei 660 nm die Protein-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Eichung erfolgt mit Rinderserumalbuminstandardlösungen.

#### 2.2.4 Bestimmung von Phosphat nach Fiske und Subbarow, 1925; Bartlett, 1959

Vor der Bestimmung wird das zu analysierende Material mit 10% TCA gefällt, abzentrifugiert, der Niederschlag zweimal gewaschen und schließlich in 100% Ameisensäure aufgenommen. Die Probe sollte 3-4 mg Protein für die Phosphatanalyse enthalten. Sie wird nun mit 0.2 ml 10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und für mindestens 4 Stunden bei 160°C verkohlt. Je nach eingesetzter Proteinmenge wird die Probe mit 0.5-1.5 ml 30%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt, um die Kohle quantitativ durch Oxidation zu  $\text{CO}_2$  umzusetzen. Durch Inkubation bei 160°C über Nacht wird das  $\text{H}_2\text{O}_2$  vollständig entfernt. Anschließend wird die Probe mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest auf 1 ml aufgefüllt, mit 0.4 ml 2.5%iger Ammonium-

molybdatlösung, 3.4 ml  $H_2O$  bidest, 0.2 ml ANSA versetzt und 5-10 min bei  $100^{\circ}C$  inkubiert. Eichproben und Blindwert werden ebenso behandelt. Die Extinktion wird bei 660 nm bestimmt.

Zusammensetzung der ANSA-Lösung:

7.44% Na  $HSO_3$ , 0.25%  $Na_2 SO_3$ , 1.25% 1-Amino-, 2-hydroxynaphthalin-4-Sulfonsäure.

#### 2.2.5 Enzymatische Bestimmung von Glucose-6-Phosphat und ATP nach Lamprecht und Trautschold, 1974

Die Quantifizierung erfolgt photometrisch im Zeiss PMQ II-Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Die zu untersuchende Probe wird in der Küvette mit 0.1 M Tris/HCl pH 7.6, 10 mM NADP, 100 mM  $MgCl_2$  gemischt und die Extinktion ( $E_1$ ) bei 340 nm abgelesen. Zum Starten der Reaktion 1 (Bestimmung von G-6-P) wird Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Handelspräparat; Konzentration des Enzyms im Ansatz: 0.5 mM) hinzugegeben und nach 5 min die Extinktion ( $E_2$ ) abgelesen.

Um den Gehalt an ATP in der Probe zu bestimmen, wird in den Testansatz Glucose (Konzentration im Ansatz: 50 mM) gemischt, die Extinktion ( $E_3$ ) abgelesen und die enzymatische Reaktion mit Hexokinase (Handelspräparat; Konzentration im Ansatz: 50 mM) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion wird wiederum die Extinktion ( $E_4$ ) bei 340 nm abgelesen.

Berechnung der G-6-P-Konzentration im Testansatz:

$$\Delta E_{G-6-P} = E_2 - E_1$$

$$G-6-P [\mu\text{Mol/ml}] = 0.336 \cdot \Delta E_{G-6-P}$$

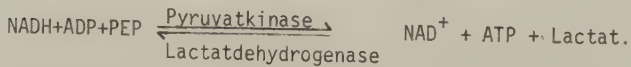
Berechnung der ATP-Konzentration im Testansatz:

$$\Delta E_{\text{ATP}} = E_4 - E_3$$

$$\text{ATP } [\mu\text{Mol/ml}] = 4.82 \cdot \Delta E_{\text{ATP}}$$

#### 2.2.6 Enzymatische Bestimmung von ADP nach Jaworek et al., 1974

Die Menge des in der Probe enthaltenen ADP's wird indirekt über die Menge NADH bestimmt, die während der folgenden Reaktion verbraucht wird:



Die Durchführung des Tests erfolgt bei Raumtemperatur. In der Küvette (1 cm Schichtdicke) werden gemischt: 1.43 ml 0.05 M Tris/HCl, pH 7.6, 0.15 ml 14 mM PEP, 0.5 M  $\text{MgSO}_4$ , 1.8 M KCl, 0.05 ml 14 mM NADH, 0.02 ml Lactatdehydrogenase (Handelspräparat; 5 mg/ml in 3.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 0.4 ml Probe und 0.02 ml Pyruvatkinase (Handelspräparat; 2 mg/ml in 3.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Vor und nach Zugabe von Pyruvatkinase wird die Extinktion bei 340 nm gemessen.

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$\text{ADP } [\mu\text{Mol/ml}] = \Delta E_{\text{ADP}} \cdot 6.22$$

#### 2.2.7 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten mithilfe der analytischen Ultrazentrifuge

Die Messungen werden bei 6 °C in einer Beckman-Sphingo-Ultrazentrifuge Modell E durchgeführt. Die Konzentrationsverteilung über die Zellenlänge wird mit einem photoelektronischen Scanner bei einer Wellenlänge von 280 nm registriert. Aus der Auftragung des Logarithmus der Wanderungsstrecke  $x$  der Protein-Lösungsmittelgrenzschicht gegen die Zeit werden

die Sedimentationskoeffizienten nach folgender Gleichung berechnet:

$$S_{60^{\circ}\text{C}_w} = \frac{2.303}{60 \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \ln x}{dt}$$

$x$  = Abstand Grenzschicht vom Rotationsmittelpunkt

Für den Sedimentationskoeffizienten bei 20°C gilt:

$$S_{20^{\circ}\text{C}_w} = S_T \cdot \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{T,x,P}}{\eta_{T,x,w}} \cdot \frac{1-\bar{v} \cdot \rho_{20,w}}{1-\bar{v} \cdot \rho_{P,T}} \quad \rho_{T,P} = \frac{\rho_{T,x,P}}{\rho_{T,x,w}} \cdot \rho_{T,w}$$

$T$  = Temperatur, bei der der S-Wert bestimmt wurde

$T_x$  = beliebige Temperatur

$\eta$  = Viskosität

$\rho$  = Dichte

Index P = Probe

$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen

Der Umrechnungsfaktor von  $S_{60^{\circ}\text{C}_w}$  auf  $S_{20^{\circ}\text{C}_w}$  beträgt für das Troponin: 1.4.

## 2.2.8 Reinigung von Harnstoff für die Isoelektrische Fokussierung

Harnstoff (p.A. von Merck) muß vor dem Einsatz in der IEF von geladenen Teilchen befreit werden, damit die Ausbildung eines stabilen linearen Gradienten nicht gestört wird. Die Reinigung geschieht über einen mixed-bed Ionenaustauscher (Biorad) im Batchverfahren. Mithilfe einer Leitfähigkeitsmeßelektrode kann die Effektivität der Reinigung überprüft werden.

Vor der Reinigung über den Ionenaustauscher beträgt die Leitfähigkeit einer 6 M Harnstofflösung bei Raumtemperatur ca. 0.7 mS.

Nach dreimaliger Behandlung (jeweils 5 min in Ionenaustauscher stehen lassen und anschließend abnutschen) mit dem mixed-bed Ionenaustauscher

liegt die Leitfähigkeit bei  $\leq 10 \mu\text{S}$ .

Um die Ausbildung eines stabilen linearen pH-Gradienten nicht zu gefährden, sollte die Leitfähigkeit des Harnstoffs  $10 \mu\text{S}$  nicht überschreiten.

#### 2.2.9 Isoelektrische Fokussierung im Sucrosegradienten

Die Fokussierung wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem linearen Sucrosegradienten in der LKB-Fokussiersäule (Volumen: 80 ml) durchgeführt.

Die Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

##### Anodenlösung:

4 ml 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 20 g Sucrose gelöst in 12 ml 6 M Harnstoff mit einer Leitfähigkeit von  $4 \mu\text{S}$  ( $\approx 60\%$ ige Sucroslösung)

##### Schwere Gradientenlösung

27 g Sucrose gelöst in 35 ml 6 M Harnstoff ( $4 \mu\text{S}$ ), 1 ml Pharmalyte pH-Bereich 3-10 und 1 ml der zu trennenden Probe

##### Leichte Gradientenlösung

2.7 g Sucrose gelöst in 13 ml 6 M Harnstoff ( $4 \mu\text{S}$ ), 1 ml Pharmalyte pH-Bereich 3-10 und  $40 \mu\text{l}$  Probe

##### Kathodenlösung

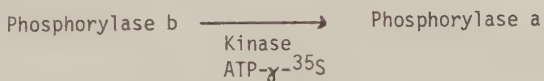
7.5 ml 6 M Harnstoff ( $4 \mu\text{S}$ ), 2.5 ml NaOH

Die leichte und die schwere Gradientenlösung werden im Gradientenmischer gemischt und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 24 ml/h vorsichtig auf die schwere Anodenlösung gepumpt. Der Sucrosegradient wird dann mit der leichten Kathodenlösung überschichtet.

Bei 9 Watt konstanter Leistung benötigt die Fokussierung etwa neun Stunden. Danach wird der Säuleninhalt mit ca. 25 ml/h eluiert und fraktioniert. Die Ausbildung des pH-Gradienten wird durch Messung des pH's in den Fraktionen mithilfe der pH-Elektrode überprüft. Die Fraktionen, die die Proben enthalten, müssen durch TCA-Fällung und Dialyse von Sucrose und Ampholinen befreit werden.

#### 2.2.10 Aktivitätstest des ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ nach Eckstein, 1977

Die Aktivität des ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  kann über die Invertierung von Phosphorylase b zu Phosphorylase a bestimmt werden:



Dazu wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

30  $\mu\text{l}$  Phosphorylase b (43 mg/ml)  
10  $\mu\text{l}$  Phosphorylasekinase (3 mg/ml)  
100  $\mu\text{l}$  Tris/HCl-Puffer pH 8.6  
30  $\mu\text{l}$  ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  (15 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 10  $\mu\text{l}$  1 M Magnesiumacetatlösung.

Die Inkubation des Testansatzes erfolgt bei 30°C im Wasserbad.

Nach bestimmten Zeiten werden aus dem Testansatz Aliquote entnommen, auf Whatman Glasfaserfilter (GF, 2.6 cm  $\varnothing$ ) pipettiert, in 10% TCA mehrmals gewaschen, getrocknet und in Toluol im Scintillationszähler im  $^{14}\text{C}$ -Kanal gezählt.

## 2.2.11 Aktivitätstest der Phosphorylasephosphatase modifiziert nach Haschke et al., 1970

0.1 ml Probe in 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 0.1 mM  $\text{MnCl}_2$  (pH 7.5) werden mit 0.1 ml  $^{32}\text{P}$ -markierter Phosphorylase a in 2.5 ml in 50 mM Tris/HCl, 0.1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM DTE (pH 7.5) im Wasserbad bei  $30^\circ\text{C}$  15 min inkubiert. Die Reaktion wird beendet durch Zugabe von 0.1 ml BSA-Lösung (25 mg/ml) und durch Fällung mit 0.7 ml 10%iger TCA. Der Niederschlag wird in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und vom Überstand 0.5 ml in 5 ml Dioxan-scintillator auf freigesetztes  $^{32}\text{P}$  untersucht ( $\text{cpm}_{\text{probe}}$ ).

Die Gesamtradioaktivität der verwendeten Phosphorylase a ( $\text{cpm}_{\text{Total}}$ ) wird bestimmt, indem man im Testansatz die Probenlösung durch 0.1 ml Puffer ersetzt und, wie oben beschrieben, abgestoppt. 0.5 ml des Überstandes werden zur Ermittlung des Blindwertes ( $\text{cpm}_0$ ) entnommen. Der Niederschlag wird in 0.1 N NaOH aufgelöst und 0.5 ml im Scintillationszähler gezählt ( $\text{cpm}_{\text{Total}}$ ).

Die Phosphataseaktivität wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_0) \times 25 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{(\text{cpm}_{\text{Total}} - \text{cpm}_0) \times \text{min}} = \text{E/ml}$$

Eine Phosphatase-Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge Enzym, die unter den angegebenen Bedingungen 1 nMol  $^{32}\text{P}$ -Phosphat pro Minute freisetzt.

## 2.2.12 Einbau von $^{32}\text{P}$ bzw. $^{35}\text{S}$ in Protein nach Mans und Novelli, 1961

Zusammensetzung der Reaktionsansätze: (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 15 mM ME,  $10\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  (Titrisol) 4 mM Magnesiumacetat;  $60\mu\text{g/ml}$  Phosphorylasekinase  $600\mu\text{g/ml}$  Troponin.

Gestartet wird die Reaktion mit  $\text{ATP-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  bzw.  $\text{ATP-}\gamma\text{-}^{35}\text{S}$  (Konzentration im Ansatz: 2 mM). Die Inkubation erfolgt bei  $30^{\circ}\text{C}$  im Schüttelwasserbad.

Aus dem Reaktionsansatz werden nach bestimmten Zeiten Aliquote auf Glasfaserfilter (Whatman, GFIC, 2.6 cm  $\varnothing$ ) pipettiert und sofort in 10% TCA, 1%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_4$ , 1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  getaucht. Dabei präzipitiert das Protein und wird an den Glasfasern festgehalten, nicht gebundenes radioaktives Material bleibt in Lösung. Nach 30 min werden die Filter je 20 min

- a) in frischer Lösung gleicher Zusammensetzung
- b) zweimal in 10% TCA
- c) in entionisiertem Wasser
- d) in Acetongewaschen und anschließend getrocknet

Die Filter werden nun in Scintillationsgläsern mit je 5 ml Scintillationslösung im Scintillationszähler gemessen.

Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Reaktionsansatz dient ein unbehandeltes Filter mit einem Aliquot aus dem Reaktionsansatz.

Zur Bestimmung des Thiophosphateinbaus enthalten die TCA-Waschlösungen 10 mM Mercaptoäthanol.

## 2.2.13 Angaben zur Radioaktivitätsmessung

Die Bestimmung der Strahlungsintensität radioaktiver Proben wird in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (Packard, Modell 2450) in folgenden Scintillationslösungen durchgeführt:

### a) Dioxan-Scintillator

24 g Permablend, 21.84 g 2.5-Diphenyloxazol, 2.16 g 1.4-Di-(2-methylstyryl)-Benzol, 375 g Naphthalin gelöst in 3 l wasserfreiem Dioxan

b) Toluol-Scintillator

24 g Permablend auf 2 l Toluol absolut

Die Messung der Radioaktivität von  $^{35}\text{S}$ -Proben wird im  $^{14}\text{C}$ -Zählkanal durchgeführt, da diese Isotope vergleichbare Zerfallsenergien aufweisen (0.164 bzw. 0.156 MeV).

2.2.14 Lokalisation des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus im Troponin

2.2.14.1 Lokalisation mithilfe der SDS-Gelelektrophorese und Radioaktivitätsmessung im Scintillationszähler

Das phosphorylierte Troponin wird durch SDS-Gelelektrophorese in seine Untereinheiten aufgetrennt. Das Gel wird im Gilson Gelfraktionator in 1 mm dicke Abschnitte geschnitten. Jeder Abschnitt wird mit 5 ml Scintillatorlösung auf Naphthalin-Dioxanbasis versetzt und im Scintillationszähler analysiert. Durch den Vergleich der Radioaktivitätsmaxima mit der durch Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbten Proteinbanden kann der Phosphat-einbau der entsprechenden Untereinheit des Proteins zugeordnet werden. Eine quantitative Bestimmung kann bei dieser Methode direkt durch Addition der Radioaktivität pro Gelscheibe erfolgen, da es sich um eine integrale Messung handelt.

2.2.14.2 Lokalisation von radioaktiven Substanzen auf Dünnschichtplatten mithilfe des Dünnschichtscanners

Dazu wurde der Dünnschichtscanner Berthold LB 2723 mit Zählgerät LB 242K und Kompensationsschreiber RE 520 benutzt.

### 2.2.14.3 Lokalisation von radioaktiven Substanzen mithilfe der Autoradiographie

Gele werden dazu in Klarsichtfolie eingeschweißt und dann - wie auch Dünnschichtchromatographieplatten - mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat XR-5 oder XS-5) belegt und in einer Röntgen-Kassette aufbewahrt. Die Belichtungsdauer ist abhängig von der Menge an Radioaktivität und der Art des Strahlers.

Nach Beendigung der Belichtung wird der Röntgenfilm entwickelt und fixiert. Die Entwicklungsdauer liegt in der Regel zwischen 5 und 8 min (X-Ray-Entwickler von Kodak, 1:4 mit Wasser verdünnt), die Fixierungsdauer beträgt 5 min (X-Ray-Fixierer von Kodak, 1:4 mit Wasser verdünnt). Zwischen der Entwicklung und der Fixierung und im Anschluß an die Fixierung muß der Film gründlichst mit Wasser gespült werden.

### 2.2.15 Dünnschichtchromatographische Methoden

#### 2.2.15.1 Zur Identifizierung von Peptiden

Die Chromatographie von größeren Mengen Peptid (50-100 µg) kann auf mit Cellulose beschichteten Plastikfolien (Fertigplatten von Macherey und Nagel, 20 cm x 20 cm, Cel 300 M N  $\cong$  gipsfreie Cellulose) durchgeführt werden. Im Nachweis um 3 Zehnerpotenzen empfindlicher, sind die nano-HPTLC Platten F254 (Glasplatten von Macherey und Nagel, 10 cm x 10 cm, Kieselgelbeschichtung).

Die Peptidgemische werden auf die Startlinie aufgetragen, die vom Plattenrand mindestens 1 cm entfernt sein sollte und auf jeden Fall oberhalb des Pufferspiegels liegen muß. Auf der Startlinie werden die Startpunkte mit einem Abstand von 0.3 - 1 cm mithilfe eines weichen Bleistiftes markiert. Zum Auftragen der Substanz eignen sich Mikroliterspritzen mit aus-

tauschbarer Spitze, Glasmikropipetten zum Einmalgebrauch oder Pasteurpipetten, deren Spitzen zu einer Kapillare ausgezogen werden.

Um scharf abgegrenzte Flecken zu erhalten, müssen die Durchmesser der Startflecken möglichst klein gehalten werden. Die Beschichtung darf beim Auftragen der Substanz nicht verletzt werden.

Bevor die Dünnschichtplatte in die Trennkammer überführt wird, muß eine vollständige Sättigung der Kammeratmosphäre erzielt worden sein. Dadurch verkürzen sich die Laufzeiten wesentlich. Die Sättigung erreicht man am einfachsten, indem man die Kammerwände mit saugstarkem Filterpapier auskleidet, und die mit dem Laufmittel gefüllte Kammer umschüttelt, so daß das Filterpapier vollständig mit dem Laufpuffer durchtränkt ist.

Als Laufmittel dient:

Butanol, Eisessig, Pyridin, Wasser im Verhältnis 1.5 : 1 : 0.75 : 2.

Puffermenge pro Kammer: 105 ml. Die Trennungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Beendigung der Chromatographie werden die Platten im Trockenofen bei 80°C getrocknet, anschließend mit Ninhydrinsprühareagenz (Merck) gleichmäßig besprüht und ca. 10-15 min bei 60°C im Trockenschrank entwickelt.

#### 2.2.15.2 Zur Bestimmung von ATP, ADP und ATP- $\gamma$ -S nach Goody und Eckstein, 1971

Zur analytischen Auftrennung von Nukleotidgemischen bzw. der Thiophosphatanaloga werden Fertigplatten mit Polyäthylenimprägnierter Cellulose (PEI-Cel) MN 300 (5 cm x 20 cm), Schichtdicke 0.1 mm von Macherey und Nagel mit Fluoreszenzindikator für 254 nm benutzt. Als Laufmittel wird für die Trennungen auf PEI-Cellulose 0.17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3.4 verwendet.

Die Positionen der aufgetrennten Nukleotide werden durch Beleuchten mit UV-Licht festgestellt (Löschen der Fluoreszenz durch UV-absorbieren-des Material). Die  $R_f$ -Werte der Nukleotide sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tabelle 1  $R_f$ -Werte von Nukleotiden nach Goody und Eckstein, 1971

| Nukleotid                     | $R_f$ |
|-------------------------------|-------|
| ADP                           | 0.49  |
| ATP                           | 0.25  |
| ATP- $\gamma$ -S              | 0.10  |
| ATP- $\gamma$ -S<br>-Disulfid | 0.08  |

#### 2.2.16 Entfernen von SDS aus Proteinlösungen mithilfe der Ätherextraktion

Schneller als durch Dialyse und schonender als durch Acetonfällung wird das SDS aus Proteinlösungen mithilfe der Ätherextraktion entfernt. Der Äther wird im Dunkeln über  $\text{FeSO}_4$  aufbewahrt, um die Peroxidbildung zu verhindern.

Die Proteinlösung wird mit einem fünffachen Überschuß an Äther in einem Scheidetrichter mehrmals kräftig durchgeschüttelt, wobei der Trichter zwischendurch entlüftet werden muß. Anschließend läßt man den Scheidetrichter ruhig stehen, bis sich zwei Phasen ausgebildet haben:

- a) die Ätherphase, die das SDS enthält
- b) die wässrige Phase, in der das Protein gelöst ist.

Die wässrige Phase wird nun vorsichtig abgelassen und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Nach Beendigung der Extraktion wird die Proteinlösung gefriergetrocknet und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.2.17 Tryptische Spaltung von $^{32}\text{P}$ -markiertem Troponin

Trypsin spaltet selektiv nach Lysyl- und Arginylresten in der Peptidkette. Die Selektivität wird jedoch empfindlich gestört durch Verunreinigung mit Chymotrypsin, die sich bei der Herstellung des Trypsins nicht vermeiden läßt. Die chymotryptische Komponente im Trypsin läßt sich mit Tosylphenylalaninchloromethylketon (TPCK) inaktivieren. Die physikalischen Eigenschaften des Trypsins (Stabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert der Temperatur) sind beschrieben bei Lazdunski und Delaye, 1967. Das pH-Optimum für die höchste Aktivität von Trypsin liegt bei pH 8.0 und das Temperaturoptimum bei  $35^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$ . Die Verdauung des  $^{32}\text{P}$ -Troponins wird bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttelwasserbad, in  $0.5\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.0 mithilfe von TPCK Trypsin (Handelspräparat, Merck) durchgeführt. Das Gewichtsverhältnis von  $^{32}\text{P}$ -Troponin zu Trypsin beträgt im Ansatz 1:20.

Während der Verdauung wird der pH-Wert überprüft. Sinkt er unter pH 8.0 ab, wird er mit verdünnter Ammoniaklösung wieder auf den Optimumswert eingestellt.

In bestimmten Zeitabständen werden Aliquote aus dem Verdauungsansatz entnommen, mit 10% TCA gefällt, abzentrifugiert und Aliquote aus dem Überstand in Dioxan gezählt. Die Inkubation wird solange fortgesetzt, bis die Radioaktivitätsmenge im Überstand konstant bleibt. Ist zu diesem Zeitpunkt die Verdauung noch unvollständig, d.h. sind weniger als 60% des Proteins verdaut, wird nochmals Trypsin zugesetzt und die Verdauung wie oben beschrieben verfolgt. Die Verdauungszeit für eine vollständige Spaltung des Troponins beträgt 2 - 3 Stunden. Um unspezifische Spaltungen und die Eigenverdauung des Trypsins zu hemmen, wird dem Ansatz

- falls er nicht direkt nach der Verdauung weiterverarbeitet wird -  
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Handelspräparat von Boehringer)  
im molaren Verhältnis Trypsin:Inhibitor = 1 : 2 zugesetzt.

## 2.2.18 Isolierung und Reinigung der $^{32}\text{P}$ -Peptide des Troponins

### 2.2.18.1 Säulenchromatographie über Sephadex-G-25

Diese Säulenchromatographie stellt eine grobe Vorreinigung dar, bei der unverdautes Material, Trypsin, ev. Trypsininhibitor und kleinere Peptide aus dem Peptidgemisch abgetrennt werden. Die Sephadex G-25 Säule (2.5 cm x 80 cm) wird in 0.5 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  äquilibriert und mit demselben Puffer werden die Peptide eluiert. Die Chromatographie wird im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, um die Gasbildung ( $\text{CO}_2$ ) des Puffers zu hemmen.

Die radioaktiven Peptide werden gefriergetrocknet und in 0.1% Trifluoressigsäure (spektroskopisch rein, Merck) aufgenommen.

### 2.2.18.2 HPLC über eine halbpräparative 'reversed phase'-Säule

Der nächste Reinigungsschritt wird mithilfe der HPLC über eine RP-18-Säule (8 mm I.D. x 250 mm, Lichrosorb (Merck): 10  $\mu\text{m}$  Korngröße) von Knauer durchgeführt.

Das zu trennende Peptidgemisch wird über das Rheodyne-Injektionssystem auf die RP-18-Säule gegeben. Eluiert werden die Peptide durch Anlegen eines linearen Acetonitrilgradienten (0%-40% Acetonitril) über die Dauer von 80 min bei einer Flußrate von 4 ml/min (3000 psi). Die Peptide absorbieren bei 230 nm.

Die Peaks werden per Hand gesammelt, die radioaktiven Fraktionen gefriergetrocknet und die Reinheit der Peptide dünnschichtchromatographisch überprüft.

Zusammensetzung des Lösungsmittels A:

0.1% TFA in H<sub>2</sub>O millipore

Zusammensetzung des Lösungsmittels B:

0.07% TFA in 95% Acetonitril (Baker, HPCL grade).

Es ist darauf zu achten, daß sämtliche für die Peptidreinigung verwendeten Lösungen frisch angesetzt und filtriert werden. Die Lösungsmittel für die Elution werden außerdem noch im Ultraschallbad oder mithilfe der Wasserstrahlpumpe (für wäßrige Lösungen) entgast.

Vor jeder Probenaufgabe wird die HPLC-Säule gespült, indem man einen linearen Gradienten (0%-100% Acetonitril) anlegt für die Dauer von ca. 20 min und 10 min mit 100% Acetonitril wäscht. So soll gewährleistet werden, daß angesammelte Verunreinigungen von der Säule eluiert werden.

#### 2.2.18.3 HPLC über eine analytische 'reversed phase'-Säule

Die Chromatographie über eine analytische RP-13-Säule (Lichrosorb, 5  $\mu$ m Korngröße, 4.6 mm I.D. x 250 mm) dient als letzter Reinigungsschritt. Die Elution erfolgt wiederum mithilfe eines linearen Gradienten (0%-40% Acetonitril) bei einer Flußrate von 1.5 ml/min ( $\approx$  2000 psi) über 60 min.

Auch hierbei wird die Reinheit der radioaktiven Peptide dünnschichtchromatographisch überprüft.

#### 2.2.19 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der radioaktiven Peptide

##### 2.2.19.1 Probenvorbereitung (Hydrolyse)

Die gefriergetrockneten Proben werden in frisch destillierter azeotroper HCl aufgenommen und in Hydrolyseröhrchen überführt, die wie alle verwendeten Glasgefäße bei 550°C im Muffelofen ausgeglüht wurden.

Um die Oxidation des Methionins während der Hydrolyse zu verhindern, wird ein Tropfen Thioglykolsäure (Merck, pA-grade) hinzugefügt. Die Hydrolyseansätze werden nun mit Stickstoff gespült und unter Vakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse wird bei  $110^{\circ}\text{C}$  über 22 Stunden durchgeführt.

Nach Beendigung der Hydrolyse werden die Proben im Eksikkator unter Vakuum über Nacht eingedampft. Nun werden die Proben in den entsprechenden Puffern für die Aminosäureanalyse aufgenommen.

#### 2.2.19.2 Aminosäureanalyse mithilfe der Ninhydrinreaktion

Die Auftrennung des Aminosäuregemisches erfolgt in einem automatischen Aminosäureanalysator (Biotronik, Serie 6000). Zur Auftrennung wird eine Ionenaustauscher-Säule (Durrum, 6 A, 0.6 cm x 27 cm) benutzt. Die Elution der Aminosäuren erfolgt mit Trilithiumcitratpuffern steigenden pH-Wertes, sowie durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  auf  $65^{\circ}\text{C}$ .

Die quantitative Bestimmung erfolgt nach Zusatz von Ninhydrin-Reagenz im Durchflußphotometer bei 440 nm bzw. 510 nm. Die Extinktion wird mit einem Schreiber registriert. Die Fläche des Extinktionssignals ist ein Maß für die Substanzmenge. Die Eichung erfolgt durch ein Gemisch von Standardaminosäureeichlösungen. Die Analysendauer mit Säulenregenerierung beträgt ca. 8 Stunden, die Trennleistung 5 nMol pro Aminosäure.

#### 2.2.19.3 Aminosäureanalyse mithilfe der OPA-Reaktion über HPLC

Zusammensetzung des OPA-Reagenzes nach Simons und Johnson, 1978 und Stanley, 1981: 500  $\mu\text{g}$  o-Phthalaldehyd (Serva, pA) wird in 10 ml absolutem Alkohol (Baker) gelöst, anschließend auf 100 ml mit 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Baker, pA) pH 9.5 verdünnt und 400  $\mu\text{l}$  Athanthiol wird zugesetzt.

Diese Mischung ist bei Raumtemperatur einige Tage stabil. Eventuell muß man nach zwei Tagen 40  $\mu$ l Äthanthiol nachsetzen.

Zur Trennung der Aminosäuren wird die RP-18-Säule (ODS, PTH von Beckmann: 5  $\mu$ m Korngröße, 4.6 mm I.D. x 250 mm) benutzt.

Vor jeder Injektion müssen Probenaufgabeschleife, Spritze und Säule gründlichst gespült werden.

Direkt vor der Injektion der Probe (50 - 100 pMol pro Aminosäure), werden Probe und OPA-Reagenz im Verhältnis 1:3 gemischt. Der Gradient wird 6 min nach dem Aufgeben auf die Säule gestartet. Eluiert wird mit einem linearen Gradienten von 5% - 100% Acetonitrilgemisch in 80 min, wobei nach ca. 45 min bei einer Flußrate von 2 ml/min das Lysin als letzte Aminosäure erscheint. Die Detektion erfolgt mit dem LDC-Fluoromonitor bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm und einer Emissionswellenlänge von 425 nm. Zur Identifizierung und quantitativen Auswertung werden Standardeichlösungen (Pierce Standard H) benutzt.

Zur Elution der Aminosäuren wird folgendes Puffersystem verwendet:

#### Lösungsmittel A

100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Baker, pA), eingestellt auf einen pH-Wert von 7.2,  
5% Tetrahydrofuran (Baker, pA; aufbewahrt über Natriumdraht).

#### Lösungsmittel B

10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Acetonitril im Verhältnis 40 : 60.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phosphorylierung von Kaninchenskelettmuskeltroponin mit calciumabhängiger Phosphorylasekinase

Vor dem Einsatz in den Phosphorylierungsansatz müssen sowohl die Phosphorylasekinase wie auch das Troponin durch Dialyse auf niedrige Ionenstärke gebracht werden, da Salze - z.B. Ammoniumsulfat - die Phosphorylierung hemmen.

In Anwesenheit von Calcium baut die Phosphorylasekinase unter Standardbedingungen durchschnittlich 0.6 - 1.0 Mol Phosphat pro Mol Troponin ein, wobei fast ausschließlich die T-Untereinheit des Troponinkomplexes phosphoryliert wird. Nur 1 - 3% vom Gesamtphosphateinbau entfallen auf die I-Untereinheit (siehe unten, Abb. 4). Unter den gewählten Phosphorylierungsbedingungen phosphoryliert sich die Phosphorylasekinase auch selbst. Diese Autophosphorylierung wird ohne Troponin getestet; sie macht maximal ein Drittel des Gesamtphosphateinbaus in Protein aus. Da Troponin nach Kiliman, 1978 keinen Einfluß auf die Autophosphorylierung ausübt, kann man den Anteil an Phosphat, der in die Phosphorylasekinase eingebaut wurde, von dem insgesamt in Protein inkorporierten Phosphat abziehen (Abb. 3).

Der Phosphateinbau in Troponin zeigt einen ungewöhnlichen Verlauf mit der Zeit (Abb. 3 und 4). In den ersten 20 - 30 Minuten der Phosphorylierung werden etwa 50% des inkorporierbaren Phosphats in das Troponin eingebaut. Im weiteren Verlauf verlangsamt sich die Phosphorylierungsrate. Zwischenzeitlich nimmt der Phosphatgehalt sogar wieder ab. Die beobachtbaren Oszillationen sind bei Troponin und Phosphorylasekinase aus verschiedenen Präparationen zeitlich verschoben.

Proteolytischer Abbau des Troponins kann als Ursache für die Oszillation

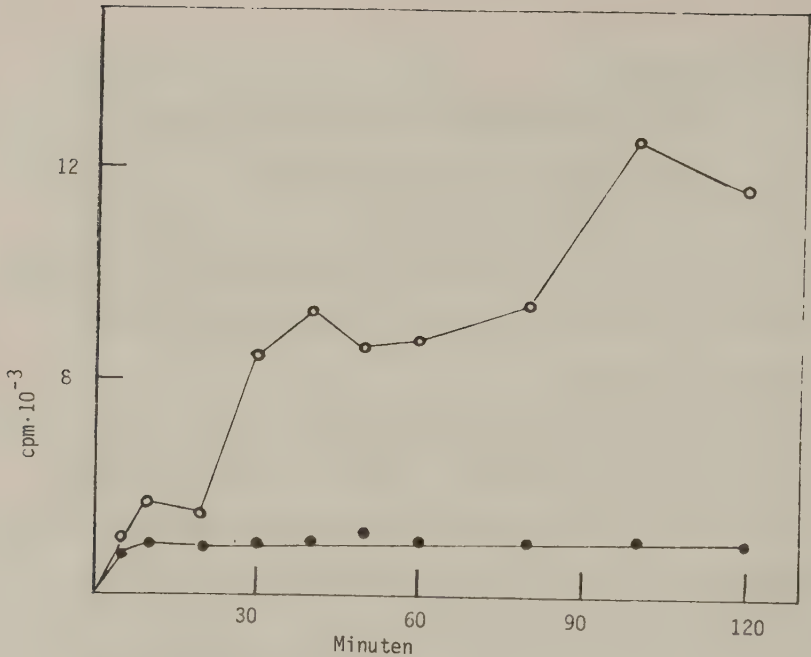


Abb. 3

Autophosphorylierung der Phosphorylasekinase (○—○) im Vergleich zum Gesamtphosphateinbau in Protein (Troponin und Phosphorylasekinase ●—●)

Die Phosphorylierung fand unter Standardbedingungen statt (s. 2.2.12). Die Autophosphorylierung wurde im Kontrollansatz gemessen (Ansatz unter Standardbedingungen, aber ohne Troponin). Der Kontrollansatz und der Ansatz zur Troponinphosphorylierung enthielten dieselbe Konzentration an Phosphorylasekinase ( $50 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ ).

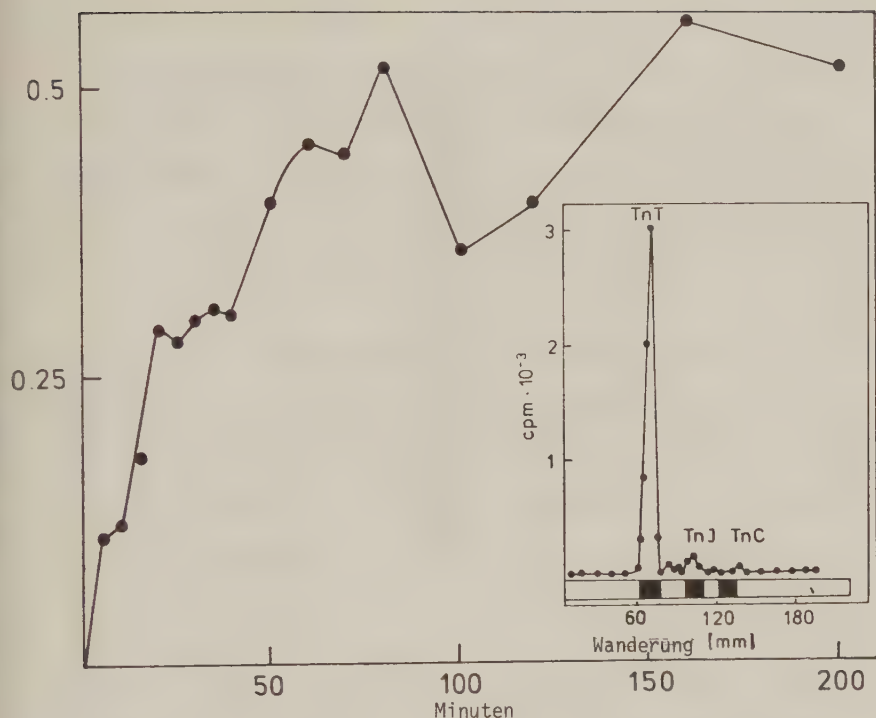


Abb. 4

Troponinphosphorylierung mit Phosphorylasekinase unter Standardbedingungen (s. unter 2.2.12).

Die Autophosphorylierung der Phosphorylasekinase wurde berücksichtigt. Für die Phosphorylierung wurden  $500\text{ }\mu\text{g}$  Troponin und  $50\text{ }\mu\text{g}$  Phosphorylasekinase eingesetzt (Gesamtansatzmenge:  $500\text{ }\mu\text{l}$ ). Nach 100 min wurde aus dem Phosphorylierungsansatz ein Aliquot entnommen ( $60\text{ }\mu\text{g}$  Troponin), mit Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese 1:1 verdünnt und 5 min gekocht. Die Probe ( $15\text{ }\mu\text{g}$  Troponin) wurde anschließend gelelektrophoretisch in Röhrgelgelen nach Weber und Osborn (s. unter 2.2.1.1) aufgetrennt. Nach der Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Gele im Gelschneider in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten (s. unter 2.2.14.1). Diese wurden dann in Dioxan im Scintillationszähler gezählt.

TnT = Troponin T

TnI = Troponin I

TnC = Troponin C

Die Banden der Phosphorylasekinase wurden hierbei nicht ausgewertet.

ausgeschlossen werden. Vor und nach der Phosphorylierung wurde das Troponin elektrophoretisch auf SDS-Gelen aufgetrennt. Es konnten keine Abbaubanden nachgewiesen werden (Abb. 5). Eine Erniedrigung des Phosphatgehaltes kann auch durch eine Phosphatasereaktion erfolgen, was - wie in den folgenden Abschnitten beschrieben - geprüft wurde.

### 3.2 Nachweise von Proteinphosphataseaktivität

Es gibt mehrere Möglichkeiten Troponinphosphatasen nachzuweisen, z.B. indirekt über die Dephosphorylierung phosphorylierten Troponins. Dazu kann man die Troponinphosphorylierung mit einem anderen ATP-verbrauchenden System koppeln und so die Kinasereaktion abstoppen. In diesem Ansatz wird dann fortlaufend der Phosphatgehalt des Troponins bestimmt. Eine Dephosphorylierung würde Proteinphosphataseaktivität anzeigen. Phosphorylasekinase kann ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S als Substrat verwenden. Das in das Protein eingebaute Thiophosphat kann von Proteinphosphatasen nicht abgebaut werden. Sind die Oszillationen im Verlauf der Troponinphosphorylierung auf Phosphataseaktivität zurückzuführen, sollten diese Schwankungen im Laufe der Thiophosphorylierung des Troponins nicht mehr auftreten.

#### 3.2.1 Nachweis der Troponindephosphorylierung

Troponin wurde mit Phosphorylasekinase unter Standardbedingungen phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde nach bestimmten Zeiten dadurch unterbrochen, daß durch zugesetzte Glucose und Hexokinase das ATP verbraucht wurde. In Abb. 6 wird gezeigt, daß innerhalb von 40 min etwa 0.4 Mol Phosphat pro Mol Troponin mit Phosphorylasekinase eingebaut wird. Nach dem Zusatz von Hexokinase und Glucose wird der erreichte Phosphorylierungszustand des Troponins nicht aufrechterhalten. Innerhalb von 30 min

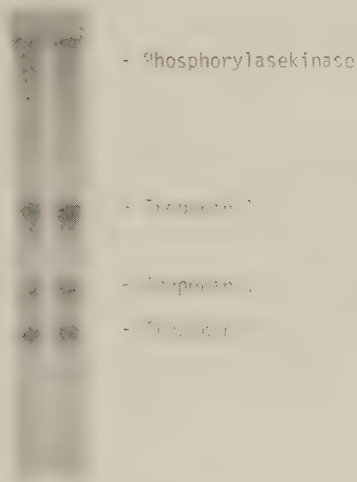


Abb. 5

SDS-Gelelektrophorese nach Cohen (2.2.1)

Troponin ( $500\mu\text{g}$ ) wurde mit Phosphorylasekinase ( $50\mu\text{g}$ ) unter Standardbedingungen phosphoryliert. Vor dem Start der Phosphorylierung durch Zusatz von ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ (a) und nach 200 min Phosphorylierungsdauer (b) wurden Aliquote ( $30\mu\text{g}$  Troponin) aus dem Ansatz entnommen und für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet (2.2.1). Pro Gel wurden  $15\mu\text{g}$  Troponin aufgetragen. Abbaubanden konnten nicht nachgewiesen werden.

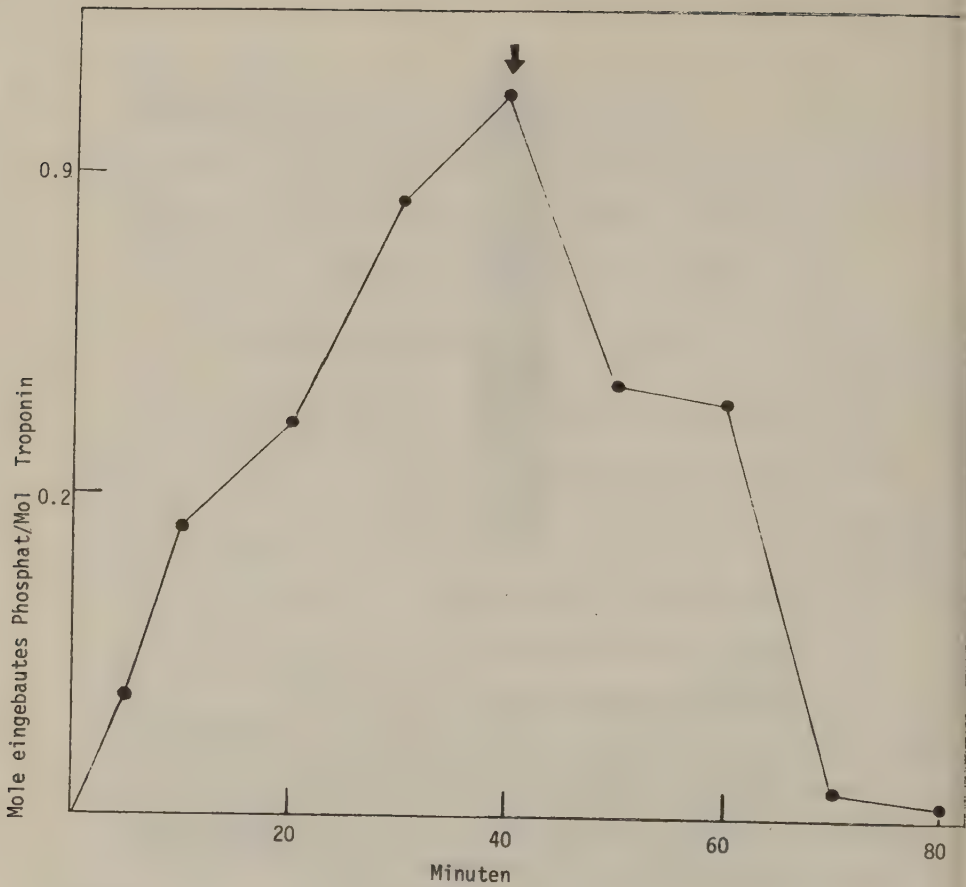


Abb. 6

Phosphorylierung von Troponin ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mithilfe der Phosphorylasekinase ( $1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ ) (Standardbedingungen s. 2.2.12) unter Zusatz von Glucose und Hexokinase.

Neben den üblichen Substanzen enthielt der Phosphorylierungsansatz 200 mM Glucose. Nach 40 min Inkubationszeit (↓) wurde dem Ansatz  $20\mu\text{g}$  Hexokinase (Handelspräparat 10 mg/ml, 140 U/min pH 6.0, 25°C) zugesetzt.

wird das in Troponin eingebaute Phosphat fast vollständig abgespalten. Dieses Ergebnis läßt eindeutig auf das Vorhandensein von Troponinphosphatasen schließen.

Zur Kontrolle, ob die Hexokinasereaktion unter den Phosphorylierungsbedingungen abläuft, wurde in einem Ansatz mit Troponin, Phosphorylasekinase, Glucose und Hexokinase der ATP-Verbrauch sowie die ADP- und die G-6-P-Bildung während der Inkubation mit enzymatischen Tests verfolgt. Aus Abb. 7 kann man entnehmen, daß parallel zum ATP-Verbrauch ADP und G-6-P entstehen. Erwartungsgemäß findet eine Troponinphosphorylierung unter diesen Bedingungen praktisch nicht statt.

### 3.2.2 Thiophosphorylierung von Troponin

Falls thiophosphoryliertes Troponin von Proteinphosphatasen, die in dem Troponin als Verunreinigung vorliegen, nicht dephosphoryliert werden kann, sollten die oben beschriebenen Oszillationsphänomene unterbunden werden und der maximale Phosphorylierungsgrad erreicht werden.

In Abb. 8 wird gezeigt, daß die Thiophosphorylierung nicht mehrphasisch verläuft. Maximal können 0.7 Mol Thiophosphat in Troponin eingebaut werden. Der Phosphorylierungsgrad ist bei Troponinen aus verschiedenen Präparationen unterschiedlich. Aus dem langsamen Ausbau des inkorporierten Thiophosphats kann man sehen, daß die Proteinphosphatasen noch aktiv sind. Allerdings ist diese Dephosphorylierung ca. zehnfach langsamer als die mit  $^{32}\text{P}$  beobachtbare Dephosphorylierung.

Aus diesen beiden Versuchen kann man schließen, daß die Oszillationen im Laufe der Troponinphosphorylierung durch Proteinphosphataseaktivität

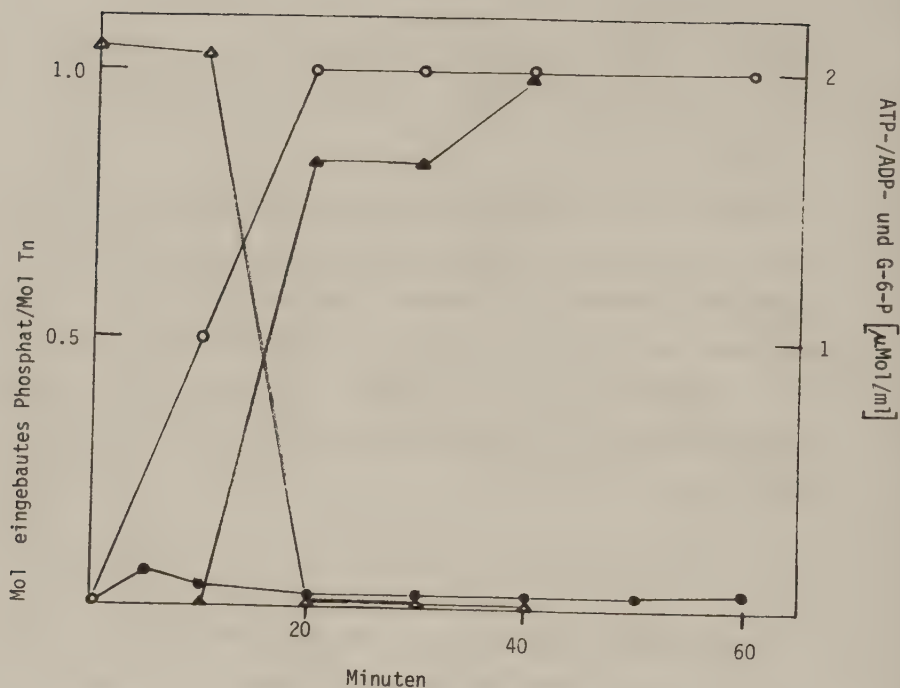


Abb. 7

Messung des ATP-Verbrauchs und der ADP- und G-6-P-Bildung während der Phosphorylierung

Dem Troponinphosphorylierungsansatz wurde vor dem Start der Reaktion durch Zugabe von ATP- $\gamma$ - $^{32}$ P Glucose (200 mM) und Hexokinase (20  $\mu$ g) zugesetzt. Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquote für den Blättchentest zur Verfolgung der Troponinphosphorylierung und Aliquote für die enzymatischen ATP-, ADP- und G-6-P-Bestimmungen entnommen (2.2.5 und 2.2.6)

- Troponinphosphorylierung
- G-6-P-Bildung
- ▲ ADP-Bildung
- △ ATP-Verbrauch

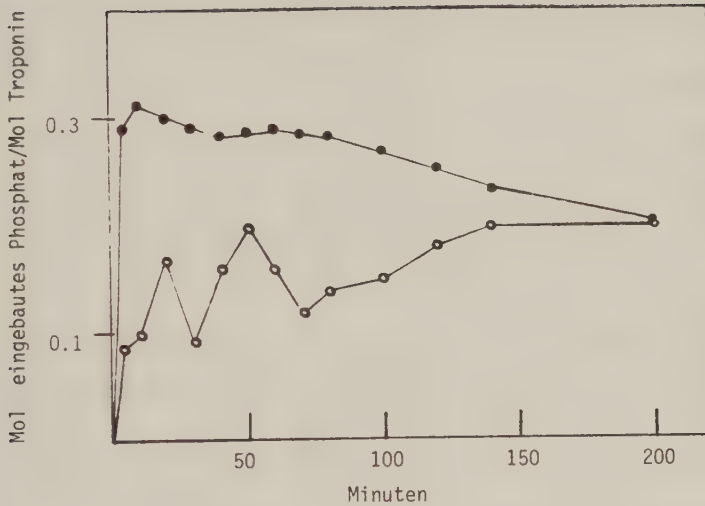


Abb. 8

Phosphorylierung mit ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  (●—●)  
und ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  (---○)

Troponin und Phosphorylasekinase stammten bei beiden Phosphorylierungsansätzen aus derselben Präparation. Die ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ - bzw. ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -Konzentration betrug 2 mM in den Ansätzen. Die Phosphorylierung erfolgte unter Standardbedingungen nach 2.2.12. Die Herstellung von ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  ist beschrieben unter 2.1.4 und 2.1.5.

verursacht werden. Vorausgesetzt, es sind zwei Phosphorylierungsseiten vorhanden, sollte man durch Entfernen der Proteinphosphatasen aus Troponin und/oder Phosphorylasekinase den Phosphorylierungsgrad erhöhen können, also ein zusätzliches Mol Phosphat pro Mol Troponin einbauen. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Phosphatasen aus Kinase und Troponin zu entfernen.

### 3.3 Versuch zur Entfernung der Proteinphosphatasen durch Affinitätschromatographie an Blauer Sepharose

Es ist in der Literatur beschrieben, daß Proteinkinasen und Proteinphosphatasen durch Affinitätschromatographie an Blauer Sepharose trennbar sind (Fulton und Carlson, 1980). Die Elutionsprofile des Troponins und der Phosphorylasekinase von Sepharose-blau sind in Abb. 9 dargestellt, die Verteilung der Phosphorylasephosphataseaktivität in Abb. 10. Die Proteinphosphataseaktivität wurde mit Phosphorylase a getestet, da sich nach Untersuchungen von Djovkar, 1979 Troponinphosphatase und Phosphorylasephosphatase gemeinsam anreichern.

Das Troponin wird in zwei Fraktionen (Tn1 und Tn2) eluiert, von denen nur das Tn1 noch Phosphorylasephosphataseaktivität zeigt. Im Bandenmuster von Tn1 und Tn2, die SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, sind nur Unterschiede in einigen Nebenbanden zu erkennen (Abb. 11). Diese sind möglicherweise den Proteinphosphatasen zuzuordnen.

Phosphorylasephosphataseaktivität wird außer in der Tn1-Fraktion auch in der Phosphorylasekinase gefunden. Die Trennung von Phosphorylasephosphatase und Phosphorylasekinase ist nicht vollständig.

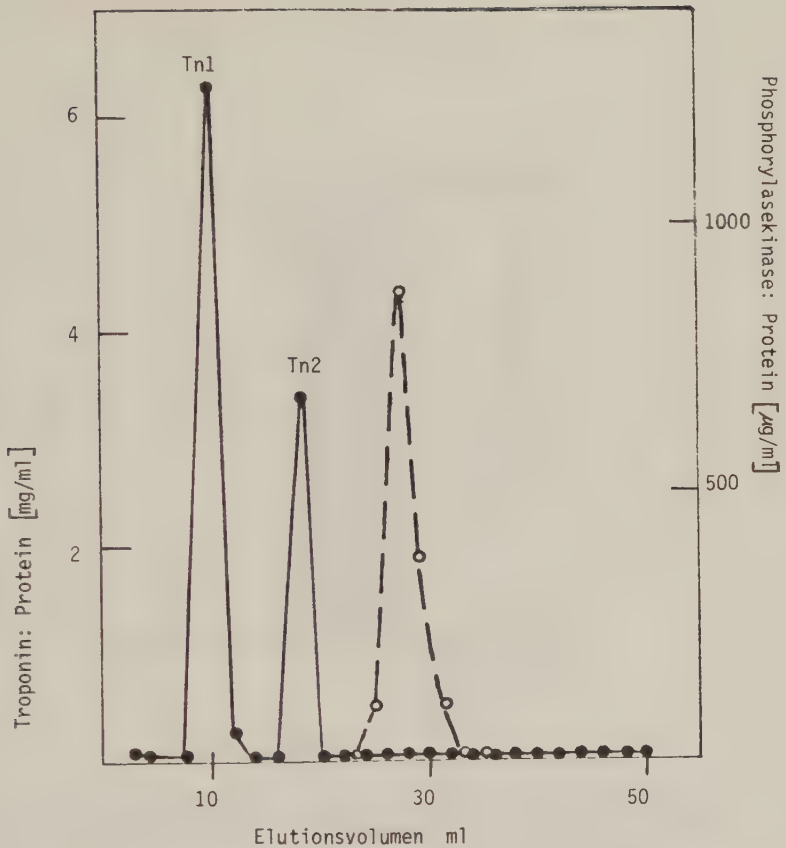


Abb. 9

Elutionsprofil der Blauen Sepharose-Säule (1.4 x 70 cm)

Elutionspuffer Troponin: 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  ●—●  
15 mM DTE

Elutionspuffer Phosphorylasekinase: 20 mM Tris/HCl pH 7.0 (○—○)  
5 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.0  
0.4 mM  $\text{EDTA}^{2-}$   
15 mM ME

Aufgetragen wurden je 10 mg Troponin und Phosphorylasekinase.

Die Ausbeute an Troponin nach der Auftrennung über Sepharose-blau betrug 77%, an Phosphorylasekinase 80%.

Mit Tn1 und Tn2 wurden die Fraktionen des Troponins bezeichnet.

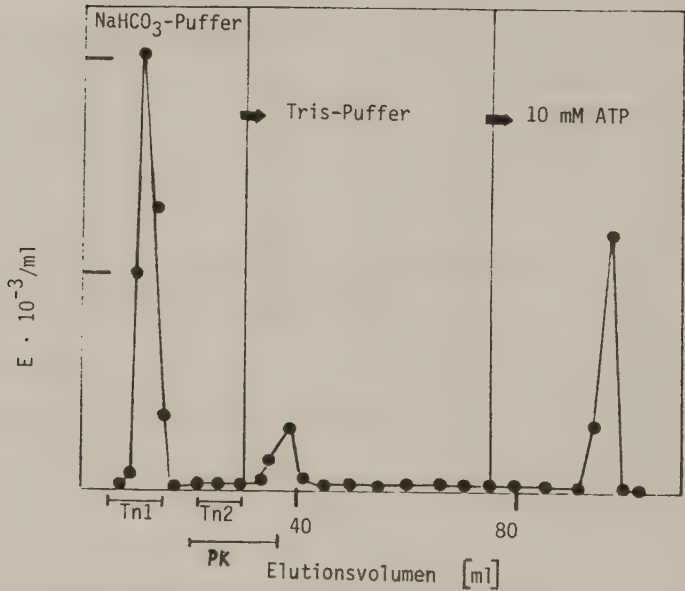


Abb. 10

Test auf Phosphorylasephosphataseaktivität mithilfe der Phosphorylase a-<sup>32</sup>P

Die Bestimmungen wurden nach der Methode von Haschke et al., 1970 durchgeführt (s. 2.2.11)

Aus jeder zweiten Fraktion nach der Auftrennung über Sepharose-blau wurden Aliquote entnommen und auf Phosphorylasephosphataseaktivität überprüft. Gemessen wurde die <sup>32</sup>P-Freisetzung aus der Phosphorylase a-<sup>32</sup>P.

$$E/ml = \frac{(cpm_{probe} - cpm_{phos a}) \times 25 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{(cpm_{total} - cpm_{phos a}) \times \text{min}}$$

Tn1 : Fraktionen des Troponin 1

Tn2 : Fraktionen des Troponin 2

PK : Fraktionen der Phosphorylasekinase

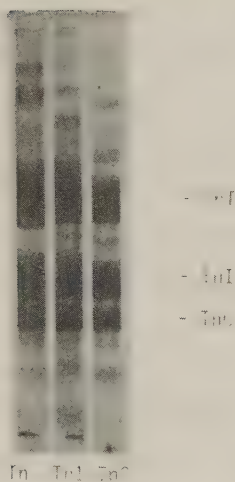


Abb. 11

SDS-Gele nach Cohen (2.2.1.2)

Pro Gel wurden 60  $\mu$ g Protein aufgetragen, da nicht nur die Hauptbanden, sondern auch das Bandenmuster der verunreinigenden Proteine gezeigt werden sollten.

Tn: Troponin vor der Reinigung über Sepharose-blau

Tn1: Troponinfraktionen nach der Reinigung

Tn2: über Sepharose-blau

TnT: Troponin T

TnI: Troponin I

TnC: Troponin C

In Abb. 12 wird gezeigt, wie sich die über Sepharose-blau gereinigten Proteine bei der Phosphorylierung verhalten. Oszillationen treten nur dann nicht mehr auf, wenn die phosphorylasephosphatasefreie Tn2-Fraktion mit der teilweise gereinigten Phosphorylasekinase phosphoryliert wird. Allerdings konnte statt 0.3 Mol Phosphat nur noch etwa 0.03 Mol Phosphat in das Troponin-Tn2 und 0.09 Mol Phosphat in das Troponin-Tn1 eingebaut werden. Die Phosphorylierungsrate in den ersten 10 min ist mit der gereinigten Phosphorylasekinase nur um etwa die Hälfte gesunken gegenüber der Phosphorylierungsrate mit ungereinigter Phosphorylasekinase. Anscheinend konnten durch die Chromatographie nur die Phosphorylasephosphatasen abgetrennt werden, nicht jedoch Troponinphosphatasen. Möglicherweise ist die niedrigere Phosphorylierbarkeit auch auf Veränderungen des Troponins während der Chromatographie zurückzuführen. Vielleicht handelt es sich bei den beiden Troponinfraktionen Tn1 und Tn2 um eine Phospho- und Dephosphoform, um Monomer und Dimer oder um Isoformen.

Die Bestimmung des endogenen Phosphatgehaltes zeigte eindeutig, daß das Tn1 wie auch das Tn2 ca. 1 Mol Phosphat pro Mol Protein enthält. Da die Phosphatbestimmung nach Bartlett sehr ungenau ist und mindestens viermal wiederholt werden muß, um einigermaßen sichere Phosphatwerte zu erhalten, ist die Eichgerade (gemittelt aus fünf Bestimmungen) in Abb. 13 dargestellt.

Die Sedimentationskoeffizienten stimmten für beide Fraktionen gut überein (3.6 S für Tn1 und 3.45 S für Tn2; s. auch Abb. 14). Der Sedimentationskoeffizient für  $(P^1)$ -Troponin ist 3.5 S. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß es sich bei den Tn1- und Tn2-Fraktionen wahrscheinlich nicht um verschiedene Assoziate handelt.

Die Beantwortung der Frage, ob Tn1 und Tn2 isomere Formen darstellen, gehört nicht zur vorliegenden Fragestellung und wurde deshalb nicht weiter

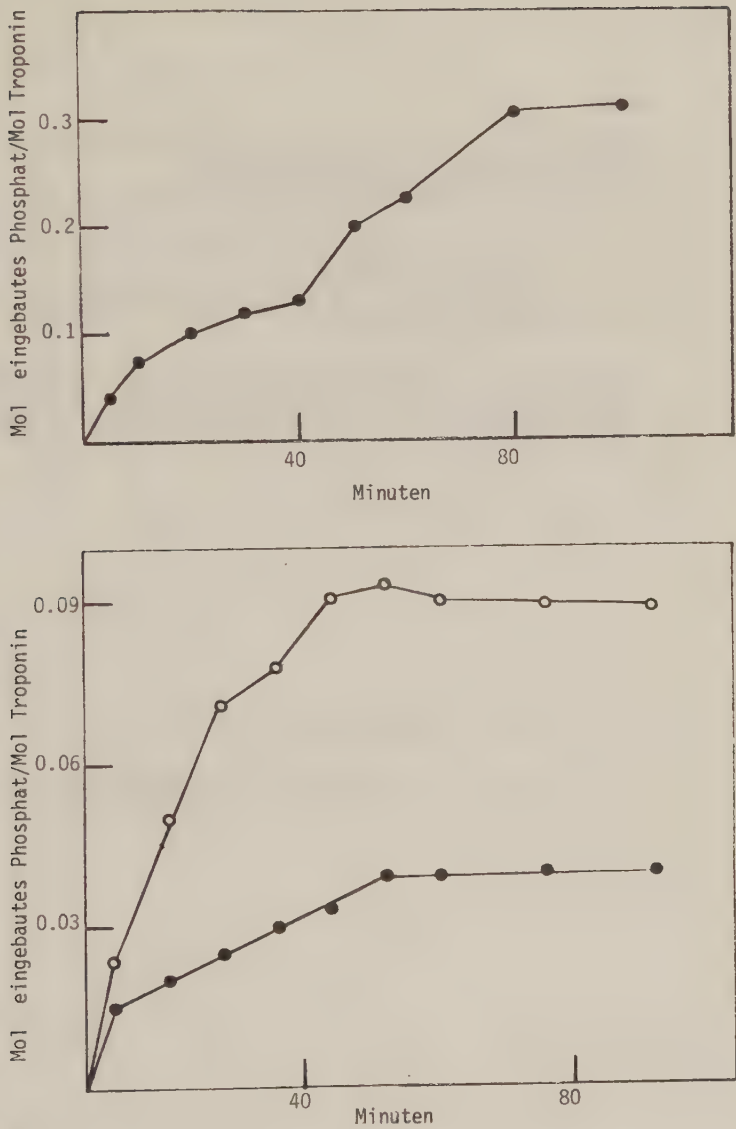


Abb. 12

Phosphorylierung nach Reinigung über Blaue Sepharose

Legende zu Abb. 12

Im oberen Bild ist die Phosphorylierung mit ungereinigten Proteinen (Troponin/Phosphorylasekinase) dargestellt ,

im unteren Bild die Phosphorylierung mit gereinigten Proteinen

○—○ Phosphorylierung der Tn1-Fraktion mit gereinigter Phosphorylasekinase

●—● Phosphorylierung der Tn2-Fraktion mit gereinigter Phosphorylasekinase

Alle Phosphorylierungen fanden unter denselben Bedingungen statt (2.2.12). Die Konzentrationen von Puffer,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgAc}$ ,  $\text{ATP-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  und die Konzentration der Proteine war in allen Ansätzen gleich.

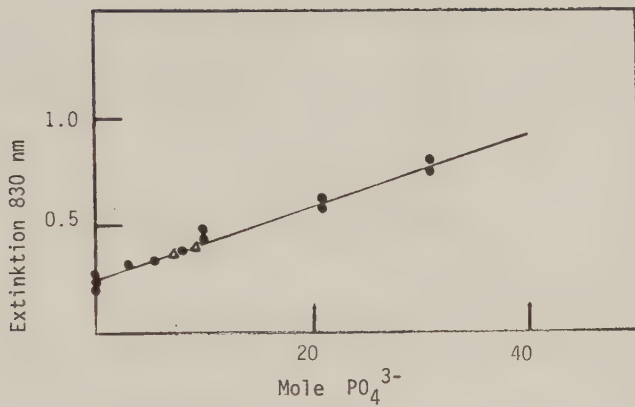


Abb. 13

Eichgerade zur Phosphatbestimmung

Die Bestimmung wurde wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt

- Punkte der Eichgerade
- △ gemessene Phosphatmenge im Troponin (Tn1 und Tn2)

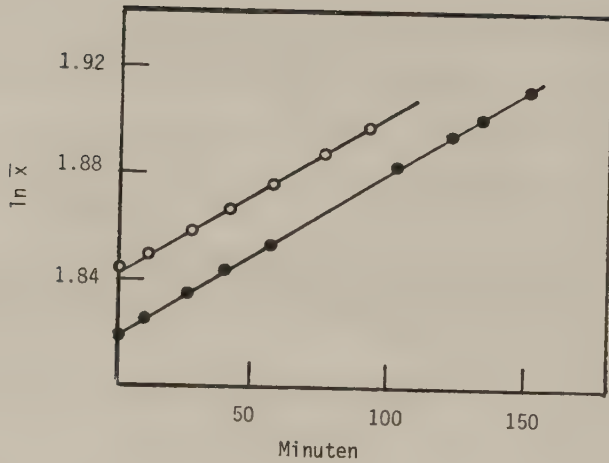


Abb. 14

Sedimentationslauf mit 0.4 mg/ml Tn1 (●—●) und 0.62 mg/ml Tn2 ○—○  
in 0.5 M KCl bei 60°C

$\bar{x}$  = Abstand der Proteinfront vom Rotationsmittelpunkt.

Die Versuche wurden wie unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt.

untersucht.

Um die eingangs aufgestellten Hypothesen zu prüfen, sollten deshalb nun die Phosphorylierungsseiten des Troponin T charakterisiert werden. Dazu wurde ein präparativer Phosphorylierungsansatz ausgearbeitet und nach tryptischer Spaltung des Troponins wurden die entsprechenden Phosphopeptide isoliert.

### 3.4 Reinigung des $^{32}\text{P}$ -markierten ( $\text{P}^1$ )-Troponins

( $\text{P}^1$ )-Troponin wurde in präparativem Maßstab mit Phosphorylasekinase phosphoryliert. Der Einbau des radioaktiv markierten Phosphats in die Troponin T-Untereinheit wurde nach SDS-Gelelektrophorese und Auszählen der Proteinbanden im Scintillationszähler bestimmt.

Aufgrund der Autophosphorylierung muß die Phosphorylasekinase vom  $^{32}\text{P}$ -markierten Troponin getrennt werden. Obwohl auf die Phosphorylasekinase nur etwa ein Drittel des insgesamt in Protein inkorporierten Phosphates entfällt, ist es möglich, daß sich die Phosphopeptide der Kinase durch die verschiedenen Reinigungsverfahren besser anreichern lassen als die Phosphopeptide des Troponins. Dadurch wäre eine eindeutige Zuordnung einer gefundenen Phosphorylierungsseite zum Troponin oder zur Phosphorylasekinase nicht mehr möglich.

#### 3.4.1 Abtrennung der Phosphorylasekinase von $^{32}\text{P}$ -markiertem ( $\text{P}^1$ )-Troponin

Es gibt mehrere Methoden, die Phosphorylasekinase (MG 1.3 Mill) vom Troponin (MG 90 500) abzutrennen.

Über Casein-Sepharose läßt sich die Phosphorylasekinase mithilfe eines negativen Ammoniumsulfat-Stufengradienten vollständig vom Troponin ab-

trennen. Das Troponin wird zu nahezu 100% wiedergewonnen. Wie man aus der Tabelle 2 ersehen kann, wird trotz der Anwesenheit von Proteinphosphatasehemmstoffen (10 mM Natriumfluorid und 10 mM EDTA) im Elutionspuffer das phosphorylierte Troponin dephosphoryliert. Nach der Auftrennung auf Casein-Sephacryl ist der  $^{32}\text{P}$ -Gehalt des Troponins um etwa eine Zehnerpotenz gesunken.

Um die Proteinphosphataseaktivität vollständig zu hemmen, wurden die Proteine im Phosphorylierungsansatz nach Beendigung der Phosphorylierungsreaktion mit SDS denaturiert und über Sephacryl S-300 gelfiltriert. Abb. 15 zeigt das Protein- und Radioaktivitätsprofil nach der Gelfiltration. Abb. 16 die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung einzelner Fraktionen.

Die Phosphorylasekinase besteht wie das Troponin aus mehreren Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ), wobei nur die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit phosphorylierbar sind. Diese werden durch Gelfiltration eindeutig von den Troponinuntereinheiten abgetrennt. Die nicht phosphorylierbaren  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten der Phosphorylasekinase werden aufgrund ähnlicher Molekulargewichte zu den Troponin I- und Troponin C-Untereinheiten mit diesen eluiert. Wie man nach elektrophoretischer Trennung auf SDS-Gelen (Abb. 15) sieht, wird ein bedeutender Anteil (ca. 80%) der Troponin I- und der Troponin C-Untereinheiten und damit auch der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten der Phosphorylasekinase durch Gelfiltration vom Troponin T abgetrennt.

Sammelt man nur die mit Troponin T angereicherten Fraktionen, so erhält man etwa eine Ausbeute von 20% bezogen auf die eingesetzte phosphorylierte Troponinmenge. Die Ausbeute wurde nach Protein- und Radioaktivitätsmessungen bestimmt.

Tab. 2    Abtrennung von Phosphorylasekinase aus dem Phosphorylierungs-  
ansatz über Casein-Sepharose (2.5 cm x 50 cm) <sup>1</sup>

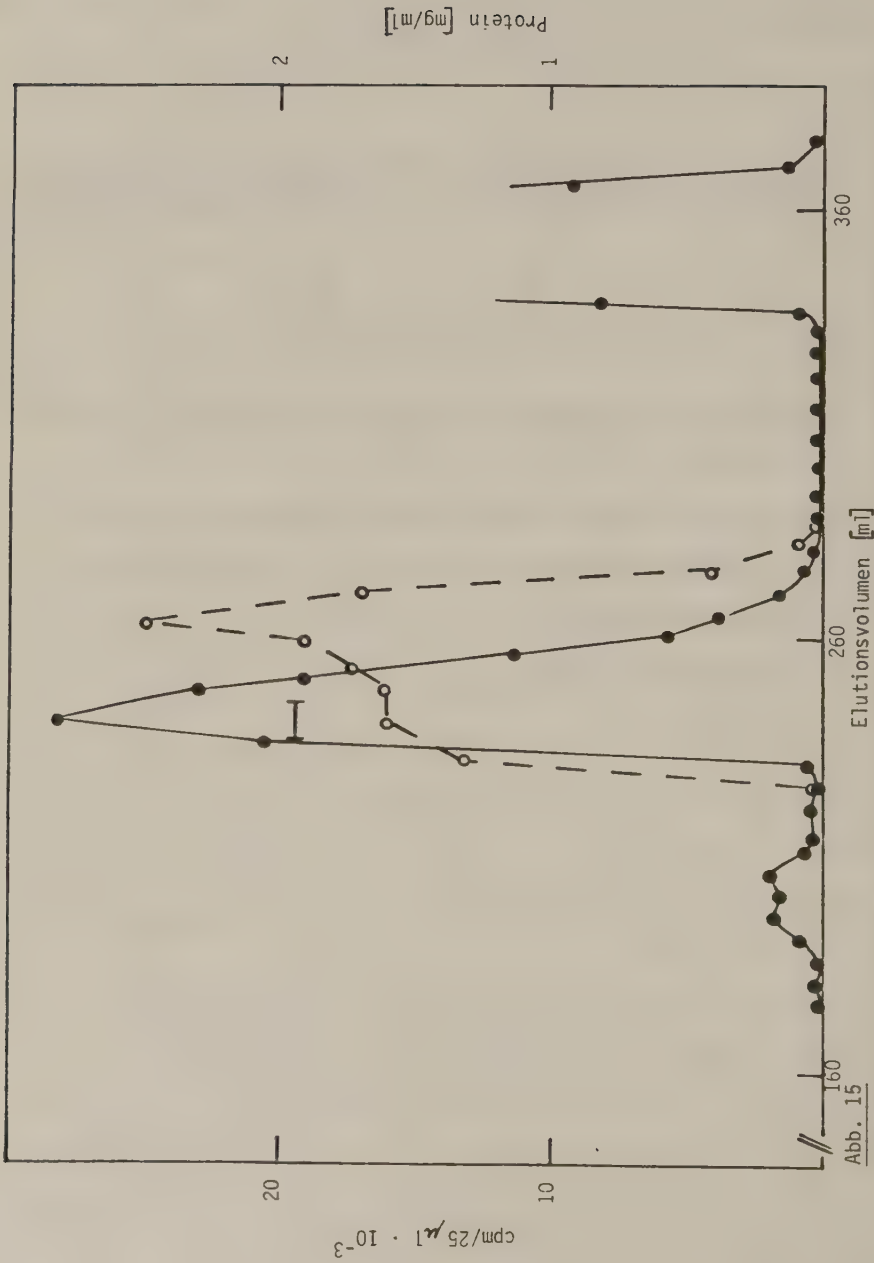
| eingesetzte Menge<br>Tn mg | eingebautes Phosphat<br>Mol Pi/Mol Tn | Eluierte Menge<br>Tn <sup>2</sup> mg | Phosphatgehalt<br>Mol Pi/Mol Tn |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 100                        | 0.5                                   | 91                                   | 0.05                            |
| 40                         | 0.7                                   | 38                                   | 0.1                             |
| 40                         | 0.65                                  | 37.6                                 | 0.04                            |

<sup>1</sup> äquilibriert in 33% gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, 10 mM NaF, 10 mM EDTA,  
0.4 M LiCl

<sup>2</sup> Elutionspuffer Troponin (Kinase bleibt an Casein-Sepharose gebunden):  
20% gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, 10 mM NaF, 10 mM EDTA, 0.4 M LiCl.  
Die Phosphorylasekinase wird mit 0.4 M LiCl eluiert.

P<sub>i</sub> = anorganisches Phosphat

T<sub>n</sub> = Troponin



Abtrennung der Phosphorylasekinase vom Troponin durch Gelfiltration über Sephacryl S 300 in SDS

Legende zu Abb. 15

Der durch SDS denaturierte und in der Amicon-Zelle über PM 10-Filter auf 15 ml eingeeengte Phosphorylierungsansatz (Proteinmenge: 11 mg/ml) wurde auf die S-300 Säule (2.5 cm x 90 cm) gegeben. Die Säule wurde auf 20°C temperiert. Der Äquilibrier- und Elutionspuffer setzte sich zusammen aus 25 mM Phosphatpuffer pH 7.0 und 0.1% SDS und 15 mM ME. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 26 ml/h wurden Fraktionen von 4 ml gesammelt, aus denen Aliquote für die Proteinbestimmung (o--o) und Radioaktivitätsmessung (●—●) entnommen wurden (2.2.3; 2.2.13).

PK( $\alpha/\beta$ ) =  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Phosphorylasekinase

TnT = Troponin T

TnI = Troponin I

TnC = Troponin C

└─ : = gepoolte Fraktionen (Ausbeute = 20%)

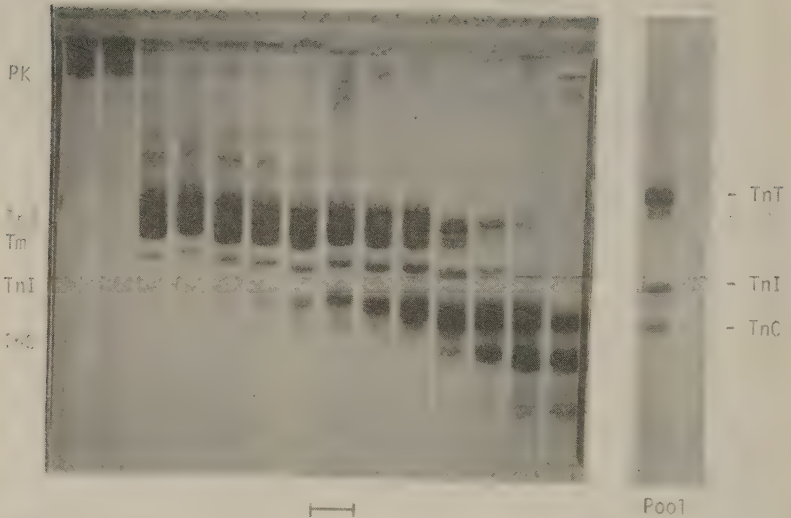


Abb. 16

#### SDS-Gelelektrophorese nach Cohen (2.2.1.2)

Aus einigen Fraktionen wurden Aliquote entnommen und mit Probenpuffer versetzt. Pro Rundgel wurden ca. 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Proteinbanden wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (2.2.1). Die gesammelten Fraktionen ( — ; Pool) wurden anschließend ebenfalls SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt.

PK radioaktivmarkierte Untereinheiten der  
Phosphorylasekinase

TnT Troponin T  
TnI Troponin I  
TnC Troponin C  
Tm Tropomyosin

### 3.4.2 Präparative isoelektrische Fokussierung des radioaktiv markierten Troponin T

Vorausgesetzt, es gibt zwei Phosphorylierungsseiten im Troponin T, kann man möglicherweise durch die isoelektrische Fokussierung einfach- und doppelthosphoryliertes Troponin voneinander trennen. Außerdem wurde versucht, das  $^{32}\text{P}$ -markierte Troponin T von den restlichen Verunreinigungen mit Troponin I, Troponin C und Tropomyosin zu reinigen.

Bei der Wahl eines weiten pH-Bereiches von pH 3-10 zeigt das Radioaktivitätsprofil nach der Fokussierung nur einen sehr breiten Gipfel mit einem Radioaktivitätsmaximum bei pH 5.8 (Abb. 17). Leider bilden die Troponinuntereinheiten an ihren isoelektrischen Punkten Flocken, die langsam durch die Säule sinken und sich über der dichten Lösung (60% Sucrose) ansammeln. Aus diesem Grund erhält man eine sehr breite Verteilung des Proteins, und die Stabilität des pH-Gradienten wird gestört.

Abb. 18 zeigt die Refokussierung des  $^{32}\text{P}$ -markierten Troponin T bei einem engeren pH-Bereich (pH 5-8). Hier läßt sich eine allerdings unvollständige Auftrennung in zwei breite Radioaktivitätsgipfel mit isoelektrischen Punkten bei etwa pH 6.8 und pH 5.8 erreichen. Auch der Gradient erweist sich als nicht besonders stabil.

Der Vorteil dieser Methode liegt in dem sehr großen Reinigungseffekt. Es konnte ein SDS-gelelektrophoretisch homogenes  $^{32}\text{P}$ -markiertes Troponin T ohne Radioaktivitätsverluste isoliert werden. So erhält man nach der tryptischen Verdauung des Proteins weniger Peptide, die dann auch leichter aufzutrennen sind.

Der Nachteil liegt in der Zeitaufwendigkeit, die wegen der geringen

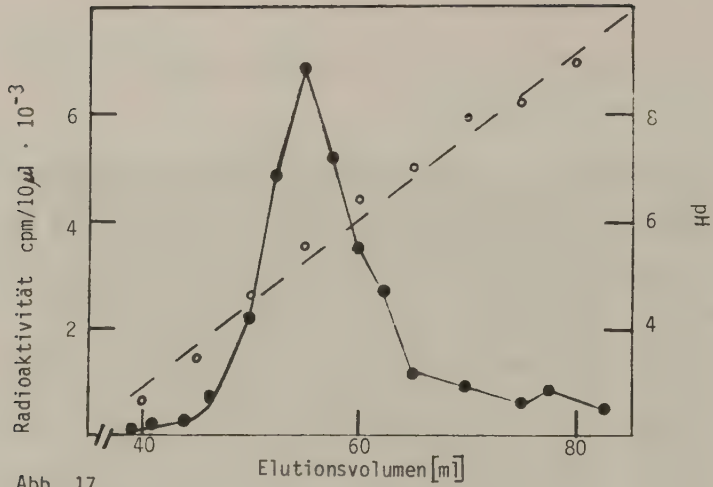


Abb. 17

Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich 3-10

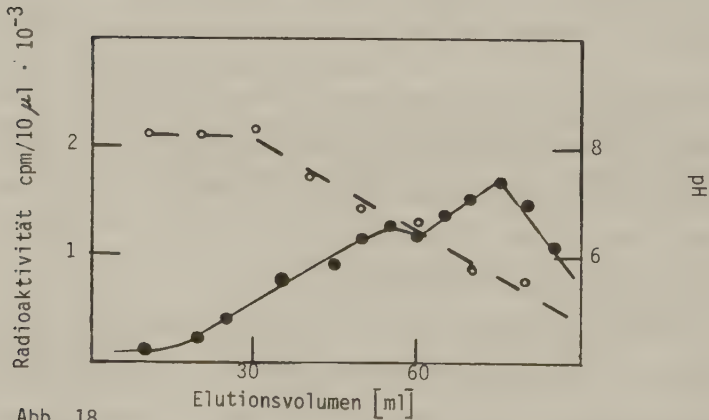


Abb. 18

Isoelektrische Fokussierung des  $^{32}\text{P}$ -Troponin T im pH Bereich 5 - 8

Legende zu Abb. 17

Die Fokussierung wurde wie unter 2.2.8 und 2.2.9 beschrieben in der LKB-Fokussiersäule in einem Saccharosegradienten durchgeführt.

Nach der Gelfiltration über Sephacryl S-300 wurde das fast homogene  $^{32}\text{P}$ -Troponin T (20 mg) Aceton gefällt und der Niederschlag abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1.5 ml 7 M Harnstoff (suprapur) und 1% Pharmalyte (pH-Bereich 3 - 10) aufgenommen und gegen 1 l derselben Lösung 4 Stunden dialysiert. Dann wurde die Proteinlösung wie unter 2.2.9 beschrieben, in die Säule gefüllt.

Dauer der Fokussierung: ca. 9 Stunden bei 9 Watt konstanter Leistung.

Mit einer Pumpgeschwindigkeit von 25 ml/h wurde der Säuleninhalt nach Beendigung der Fokussierung eluiert und fraktioniert. Aus den Fraktionen wurden Aliquote entnommen und in Dioxan im Scintillationszähler gezählt (Proteinausbeute bestimmt durch den Protein-Test nach Lowry und durch die spezifische Radioaktivität: 60%)

●—● Radioaktivitätsprofil

○—○ pH-Gradient

Die pH-Werte wurden mit der Meßelektrode  
in den einzelnen Fraktionen bestimmt

Legende zu Abb. 18

Das vorher in einem weiten pH-Bereich von pH 3 -10 fokussierte Troponin T (12 mg) wurde ohne weitere Vorbehandlung in einem engen pH-Bereich von pH 5-8 refokussiert (2.2.9)

○—○ pH-Gradient

●—● Radioaktivitätsprofil

80% (9.6 mg) des eingesetzten Materials konnten als reines Troponin T eluiert werden.

Halbwertszeit des radioaktiven Phosphats große Bedeutung hat. Daher wurde diese Methode bei allen weiteren Versuchen zur Peptid-isolierung nicht mehr angewandt.

### 3.5 Enzymatische Verdauung des $^{32}\text{P}$ -markierten Troponin T

Soll das  $^{32}\text{P}$ -Troponin T direkt nach der Gelfiltration über Sephacryl S-300 (SDS-Phosphat-Puffer) tryptisch verdaut werden, muß das SDS aus der Proteinlösung entfernt werden. Um zu testen, bis zu welchem Ausmaß diese Reinigung erfolgen muß, wurde zunächst der Einfluß der SDS-Konzentration auf die Verdauung getestet. Abb. 19 zeigt, daß erst bei einer SDS-Konzentration von 0.01% in der Proteinlösung 90% des Troponins so verdaut wird, daß es nicht mehr mit Trichloressigsäure fällbar ist. Bei einer Konzentration von 0.08% zum Beispiel wird nur 60% des Troponins verdaut.

Das wie oben beschrieben isolierte  $^{32}\text{P}$ -markierte Troponin T wurde durch Ätherextraktion weitgehend SDS-frei gemacht. Die Verdauung durch Trypsin konnte leicht anhand der Freisetzung von TCA nicht präzipitierbarer Radioaktivität verfolgt werden. Der zeitliche Verlauf ist in Abb. 20 dargestellt. Schon nach einer Stunde sind ca. 70% des Troponin T gespalten. Danach schreitet die Verdauung nur noch sehr zögernd fort. Erst durch nochmaliges Zusetzen von Trypsin können noch ca. weitere 20% des Troponin T verdaut werden.

Das so erhaltene Peptidgemisch wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Abb. 21 zeigt die Radioaktivitätsverteilung. Es sind zwei radioaktive Gipfel vorhanden. Dieses Ergebnis läßt sich durch mehrere Hypothesen erklären. Es könnte sich z.B. um zwei verschiedene Phosphopeptide handeln, d.h. es würden zwei Phosphorylierungsseiten im Troponin T

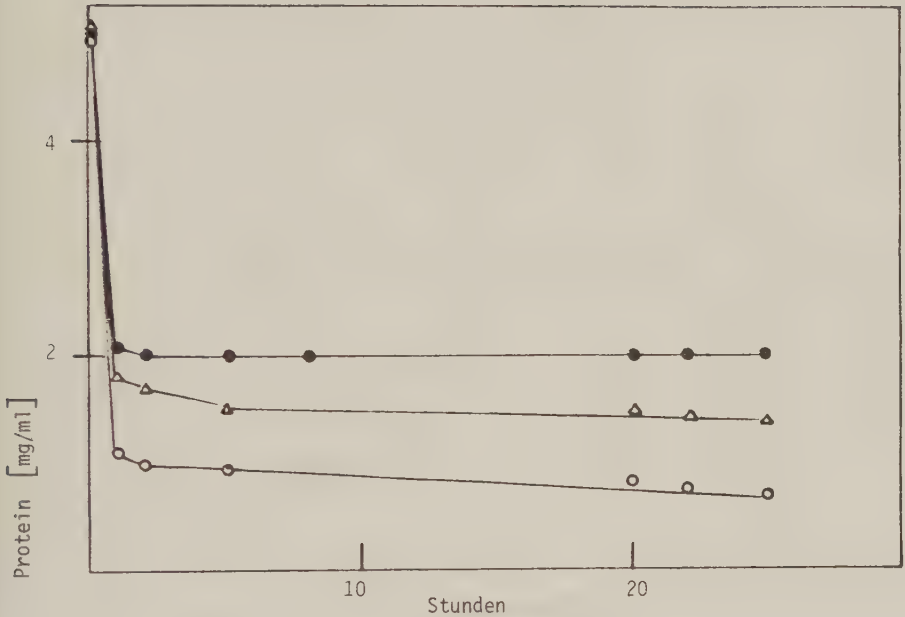


Abb. 19

Verdauung vom Holotropoinkomplex bei verschiedenen SDS-Konzentrationen

- 0.08% SDS 60% des Proteins wurde verdaut
- △—△ 0.05% SDS 70% des Proteins wurde verdaut
- 0.01% SDS 90% des Proteins wurde verdaut

Je 5 mg Troponin wurden tryptisch verdaut ( $0.5 \text{ M } \text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,  $37^\circ\text{C}$ ). Nach bestimmten Zeiten wurden Aliquote aus den Ansätzen entnommen, TCA gefällt, abzentrifugiert und die Proteinmenge des Niederschlags bestimmt.

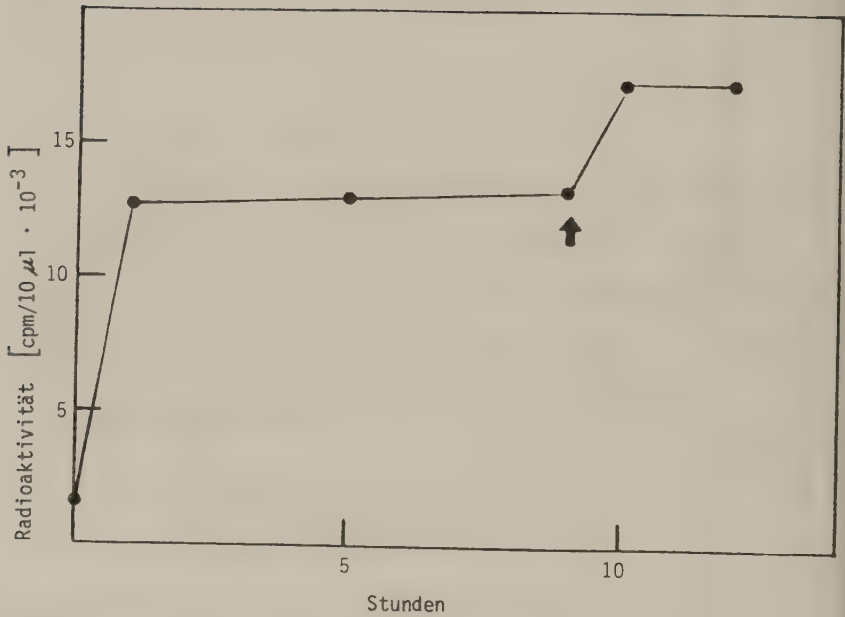


Abb. 20

Verdauung des  $^{32}\text{P}$ -markierten Troponin T

Die Verdauung wurde unter den Bedingungen wie unter 2.2.17 beschrieben, durchgeführt.

Aus dem Verdauungsansatz wurden Aliquote entnommen, TCA gefällt und der Überstand auf Radioaktivität überprüft. Nach 9 Stunden wurde Trypsin nachgesetzt (▲).  $^{32}\text{P}$ -markiertes Troponin T (isoliert durch Gel-filtration über Sephacryl S-300).

Das SDS wurde vor der Verdauung aus der Proteinlösung durch Ätherextraktion weitgehend entfernt.

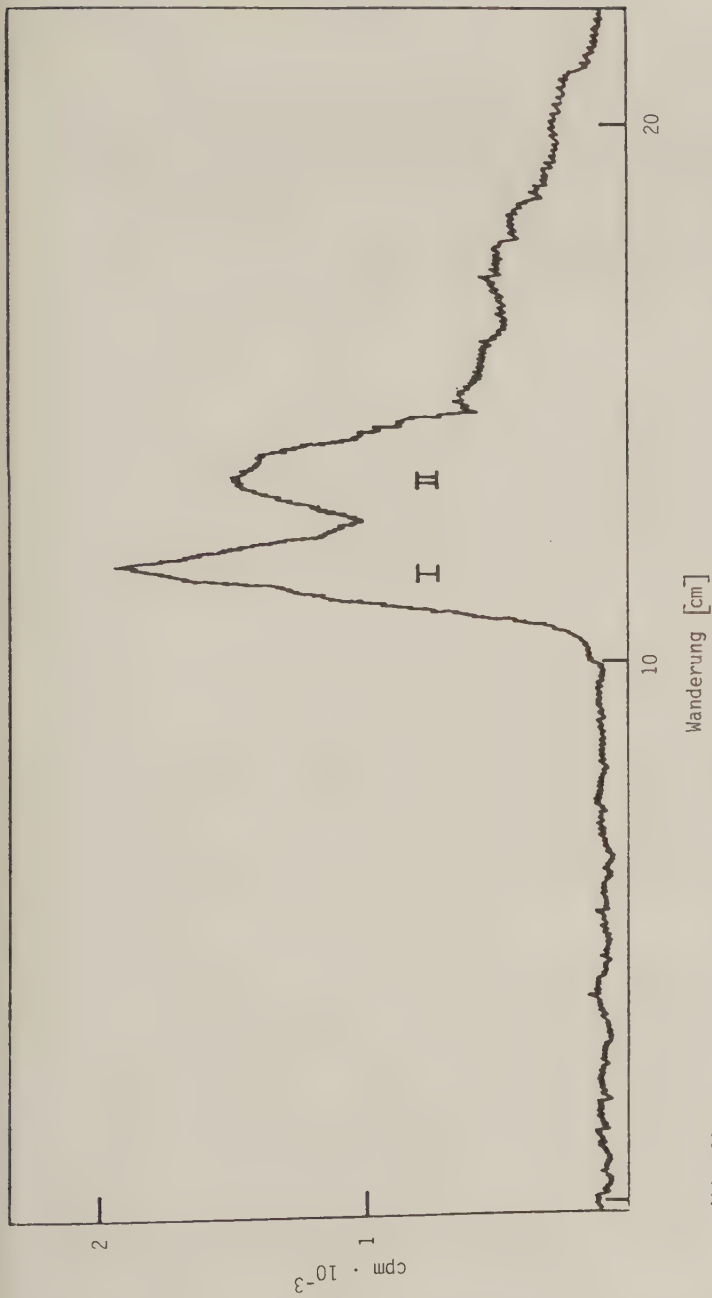


Abb. 21

Lokalisierung der Phosphatpeptide des  $^{32}\text{P}$ -TnT auf Cellulose-Dünnschichtfolien

Legende zu Abb. 21

Trypsinverdautes  $^{32}\text{P}$ -TnT ( $50\mu\text{g}$ ) wurde auf MNCell 300-Dünnschichtferti-  
fertigfolien aufgetragen und 5 Stunden bei Raumtemperatur in der  
Chromatographierkammer chromatographiert. Die Pufferzusammensetzung  
siehe unter 2.2.14.1.

Anschließend wurden die radioaktiven Peptide mithilfe des Dünnschichtscanners (Berthold LB 2723 mit Zählgerät LB 242 K und  
Kompensationsschreiber RE 520) lokalisiert.

R<sub>f</sub>-Wert I : 0.54

R<sub>f</sub>-Wert II: 0.63

existieren. Es könnte aber auch eine unvollständige Spaltung erfolgt sein, so daß doch nur eine Seite phosphoryliert wäre.

Deshalb wurden beide Phosphopeptide aus dem Peptidgemisch isoliert und näher charakterisiert.

### 3.6 Isolierung und Reinigung der $^{32}\text{P}$ -markierten Peptide des Troponin T

Für die Isolierung und Reinigung der radioaktiv markierten Peptide werden mehrere Schritte benötigt. Als Vorreinigung bewährt sich die Gelfiltration über Sephadex G-25. Hierbei werden Trypsin, unverdautes Material und einige Peptide abgetrennt. Die weitere Reinigung wird mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

#### 3.6.1 Gelfiltration über Sephadex G-25

In der Abb. 22 wird das Radioaktivitätsprofil nach der Gelfiltration der Phosphopeptide aus  $^{32}\text{P}$ -markiertem Troponin T über Sephadex G-25 dargestellt. Die Fraktionen wurden - wie angezeigt - gepoolt. Die gepoolten Fraktionen wurden weiter durch Dünnschichtchromatographie und anschließende Autoradiographie analysiert.

Pool 1 (nach ca. 200 ml Elutionsvolumen) und Pool 2 enthalten laut Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie vorwiegend unverdautes Material. In den beiden Hauptfraktionen 3 und 4 sind mehrere radioaktive Peptide vorhanden (Abb. 23). Der Grund für diese Multiplizität liegt wahrscheinlich in einer unvollständigen Spaltung durch Trypsin. Zwei Peptide mit den RF-Werten von 0.23 und 0.45 auf nano-HPTLC-Dünnschichtplatten enthalten die Hauptmenge der Radioaktivität und wurden deshalb weiter gereinigt.

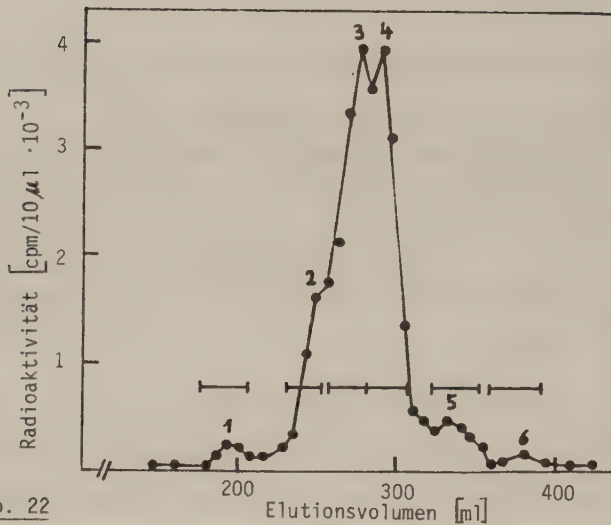


Abb. 22

Radioaktivitätsverteilung nach der Gelfiltration über Sephadex G-25

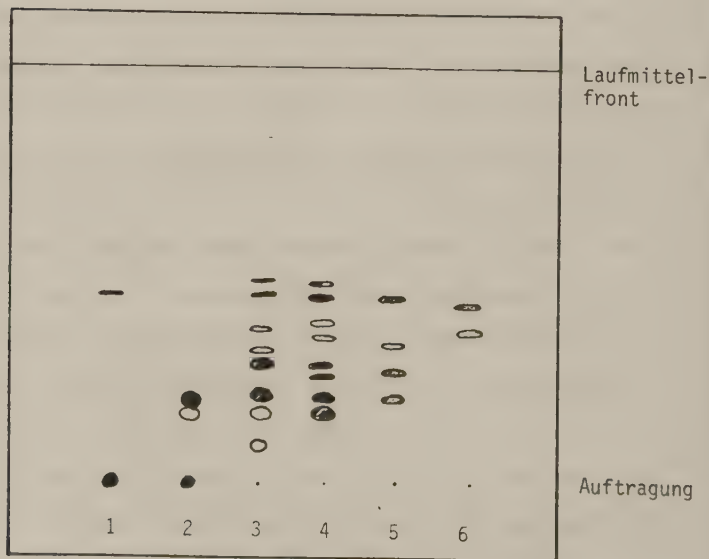


Abb. 23

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pools 1-6 auf kieselgelbeschichteten nano-HPTLC-Dünnschichtplatten

#### Legende zu Abb. 22

Nach Beendigung der Verdauung wurde der gesamte Verdauungsansatz (30 mg Protein: Trypsin, unverdautes  $^{32}\text{P}$ -Troponin T, Peptide des  $^{32}\text{P}$ -Troponin T) auf die Sephadex G-25-Säule aufgetragen.

Die Gelfiltration wurde wie unter 2.2.18.1 beschrieben, durchgeführt. Aus den Fraktionen wurden Aliquote entnommen und in Dioxan im Scintillationszähler gezählt.

Gepoolt wurden die mit Balken (—) und Zahlen gekennzeichneten Fraktionen. Die Pools 3 und 4 enthielten zusammen 83% der aufgetragenen Substanzmenge. Dieser Wert wurde über die spezifische Radioaktivität bestimmt.

#### Legende zu Abb. 23

Die Pools 1 bis 6 wurden gefriergetrocknet und anschließend in 1 ml 0.1% TFA aufgenommen. Von den Pools 3 und 4 wurden ca. 20  $\mu\text{g}$  aufgetragen (5  $\mu\text{l}$  einer vorher 1:3 verdünnten Peptidlösung). Von Pool 1, 2, 5 und 6 wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Die Chromatographie fand unter Standardbedingungen statt (2.2.15.1).

Nach Ninhydrinfärbung wurde die Dünnschichtplatte autoradiographiert (2.2.14.3)

-  ninhydrinpositiv, radioaktiv
-  ninhydrinpositiv, schwach radioaktiv
-  ninhydrinpositiv

Berechnet man die Peptidmenge aus der spezifischen Radioaktivität, so sind nach der Gelfiltration über Sephadex G-25 noch 85% radioaktives Material vorhanden, bezogen auf die zur Reinigung eingesetzte Peptidmenge.

### 3.6.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie über eine 'reversed phase' Säule (RP-18)

Die über Gelfiltration vorgereinigten Fraktionen 3 und 4 wurden auf einer RP 18-Säule im Trifluoressigsäure-Acetonitril-Gradienten weiter gereinigt. Um saubere Peptide zu erhalten, die in der Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie homogen sind, muß die Reinigung über HPLC mehrfach wiederholt werden unter leicht veränderten Bedingungen (z.B. Elution mithilfe eines flacheren Gradienten). In Abb. 24 ist ein typisches Elutionsbild der Peptide von einer RP-18-Säule dargestellt. Die römischen Ziffern I und II geben die Positionen der beiden radioaktiven Peptide an, die die Hauptmenge der Radioaktivität aufweisen. Bei den einzelnen Reinigungsschritten über HPLC erhält man eine Vielzahl radioaktiver Peptide, die sich teilweise dünnschichtchromatographisch nicht unterscheiden, was möglicherweise auf einer Trennung unterschiedlicher Konformationen einunddesselben Peptides beruht.

Nach zwei bis drei HPLC-Läufen kann man fünf verschiedene dünnschichtchromatographisch homogene Peptide isolieren (Abb. 25). Die Peptide 2, 3 und 4 zeigen nur geringfügige Unterschiede in den RF-Werten. Von Nachteil sind die überaus großen Materialverluste von ca. 30% pro Reinigungsschritt.

So erhält man je nach Anzahl der nötigen HPLC-Läufe eine Ausbeute an homogenen radioaktiven Peptiden von 0.5 bis 10 nMol (ca. 0.1-2%).

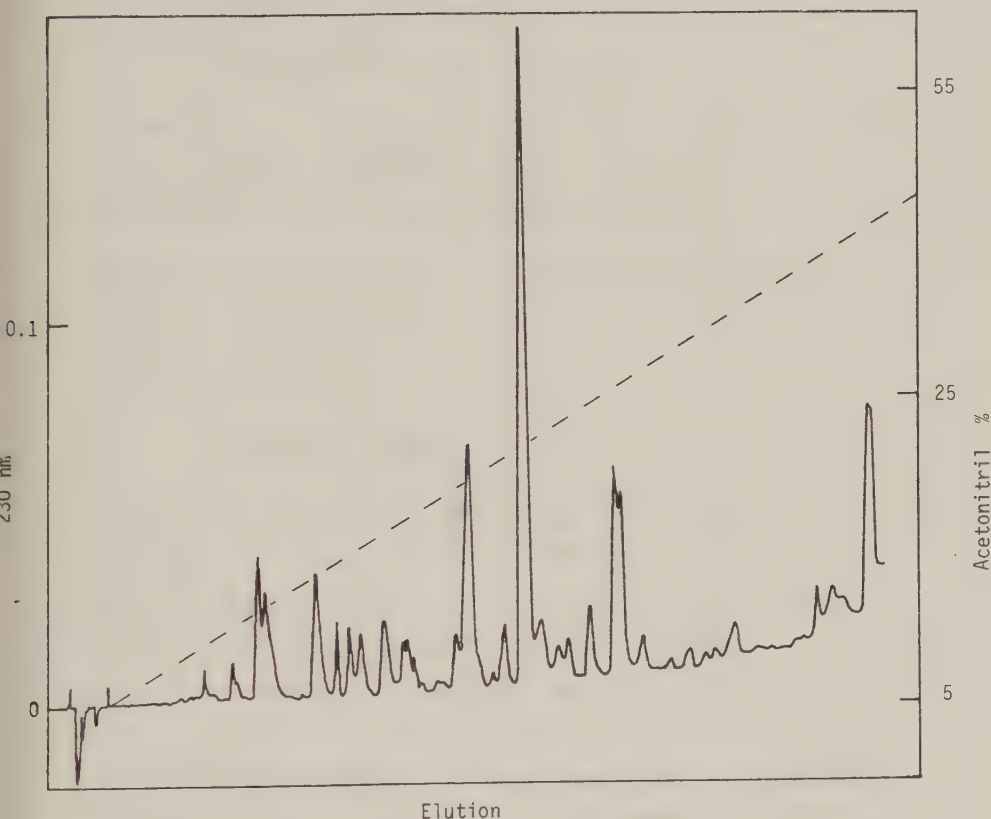


Abb. 24

Reinigung der  $^{32}\text{P}$ -Peptide des Troponins über HPLC

Ca. 2.4 mg (200  $\mu\text{l}$ ) wurden von Pool 3 bzw. Pool 4 auf eine halbpräparative RP 18 Säule (8.0 mm I.d. x 260 mm, Lichrosorb, 10  $\mu\text{m}$ ) injiziert. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 4 ml/min mithilfe eines Acetonitrilgradienten (2.218.2). Die Kolbenpumpen, Gradientenmischer, Gradientensteuergerät, Spektralphotometer mit Monochromator und Schreiber mit Integrator stammen von der Fa. Milton Roy.

Die mit I und II bezeichneten Peakgruppen enthalten die Hauptmenge an Radioaktivität. Diese wurden anschließend mehrfach über eine analytische RP 18-Säule nachgereinigt (2.2.18.3). Ausbeute an reinen Phosphopeptiden: 0.5 bis 10 n Mol.

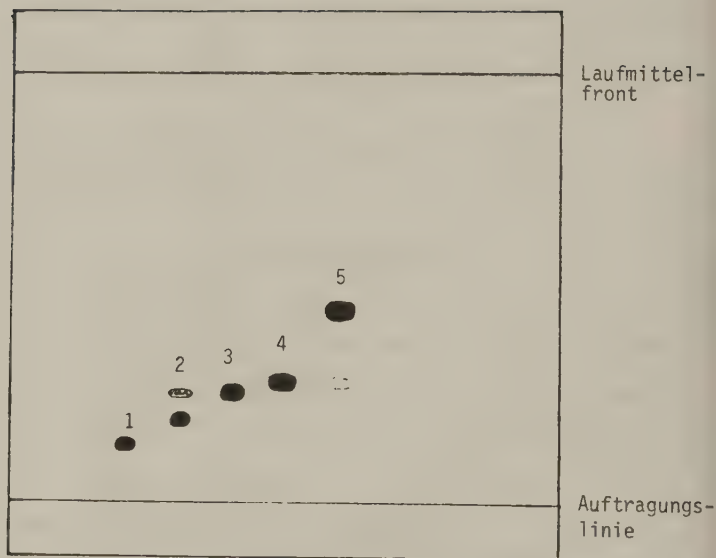


Abb. 25

Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie der über eine RP-18-Säule isolierten und gereinigten Phosphopeptide als Reinheitskontrolle

Von der RP-18-Säule wurden 10 radioaktive Peptide eluiert, von denen 5 dünn-schichtchromatographisch homogen waren.

Auf kieselgelbeschichtete HPTLC-Platten wurde jeweils 1 nMol Phosphopeptid (Menge bestimmt aus der spezifischen Radioaktivität) aufgetragen (2.2.15.1). Nach Beendigung der Chromatographie wurde die Dünnschichtplatte mit Ninhydrinreagenz besprüht und anschließend ein Röntgenfilm (XR 5) aufgelegt (2.2.14.3). In der Abbildung sind die 5 dünn-schichtchromatographisch und autoradiographisch homogenen Peptide dargestellt.

- ninhydrinpositiv und radioaktiv
- schwach radioaktiv, nicht ninhydringefärbt

### 3.7 Aminosäureanalyse der Phosphopeptide

Aufgrund der zum Teil sehr geringen Peptidausbeute konnte nicht immer die übliche Methode zur Aminosäureanalyse benutzt werden, bei der pro Aminosäure zwischen 2 und 5 nMol benötigt werden. Daher wurde eine neue weit empfindlichere Methode für diese Analyse ausgearbeitet. Die Aminosäuren werden mit  $\alpha$ -Phthalaldehyd derivatisiert und die Fluoreszenz gemessen (Stanley, 1981).

#### 3.7.1 Anmerkungen zur Aminosäurebestimmung mit $\alpha$ -Phthalaldehyd

Abb. 26 zeigt die Auftrennung eines Aminosäurestandards über eine RP-18-Säule. Vor der Auftragung auf die Säule wurden die Aminosäuren mit  $\alpha$ -Phthalaldehyd derivatisiert. Es zeigen sich sehr große Unterschiede in der Höhe der Gipfel, was bei dieser Methode unvermeidbar zu sein scheint. In Abb. 27 ist für einige Aminosäuren die Fläche der von der Säule eluierten Peaks gegen die eingesetzte Menge aufgetragen. Eine lineare Beziehung zwischen den beiden Größen ist für die meisten Aminosäuren nur in höheren Konzentrationsbereichen zu finden. Bei Arginin, Glyzin und Alanin besteht eine lineare Beziehung zwischen der Peakfläche und der aufgespritzten Menge nur in niedrigen Konzentrationsbereichen.

Um die Aminosäurezusammensetzung der Peptide genau bestimmen zu können, mußten mehrere Analysen bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt werden.

Die Standardabweichungen, bestimmt aus 10 Standardauftrennungen, liegen für die einzelnen Aminosäuren zwischen 5 und 10%.

Die quantitative Auswertung des Lysins erwies sich als besonders proble-

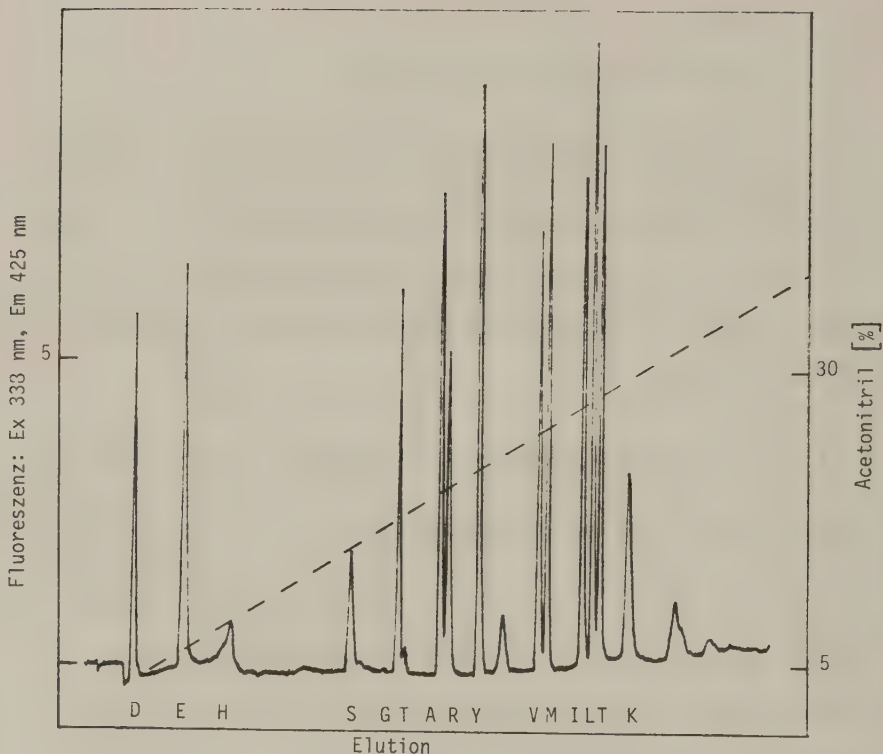


Abb. 26

Auftrennung der Aminosäuren eines Standardgemisches über eine RP-18-Säule

Die Auftrennung und Analyse der Aminosäuren wurde wie unter 2.2.19.3 beschrieben durchgeführt.

Es wurden 93.75 pMol pro Aminosäure ( 7.5  $\mu$ l) vom Pierce Standard H injiziert. Flußgeschwindigkeit 1.5 ml/min.

Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf des Gradienten wieder. Die Buchstaben kennzeichnen die einzelnen Aminosäuren.

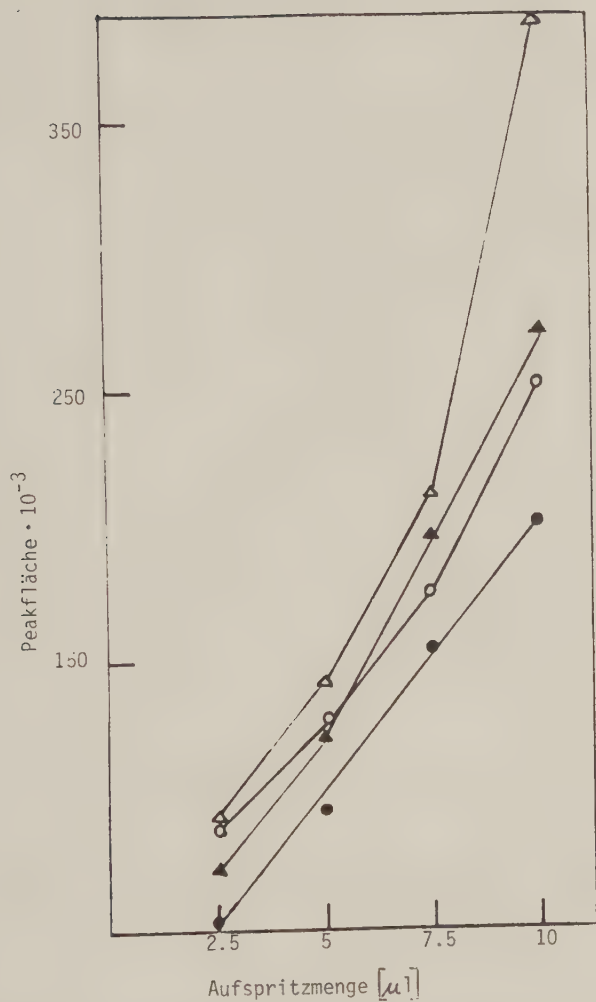


Abb. 27 a

Bestimmung der Aminosäuren als  $\alpha$ -Phthalaldehyderivate und Auftrennung über RP-18-Säule (Beckmann, ODS  $5\mu$ m)

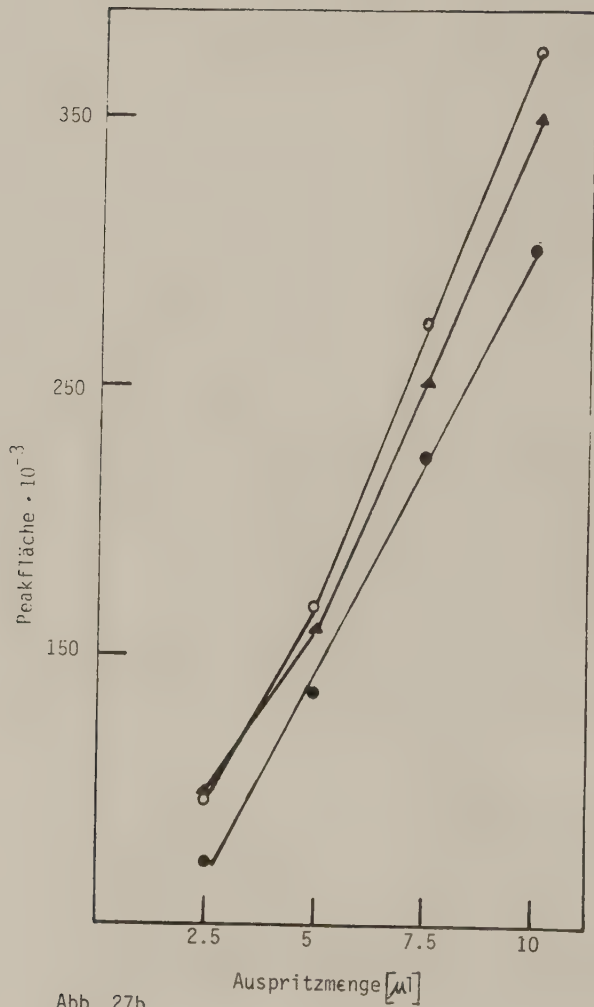


Abb. 27b

Bestimmung der Aminosäuren als *o*-Phthalaldehydderivate und Auftrennung über RP-18-Säule (Beckmann, ODS 5μm)

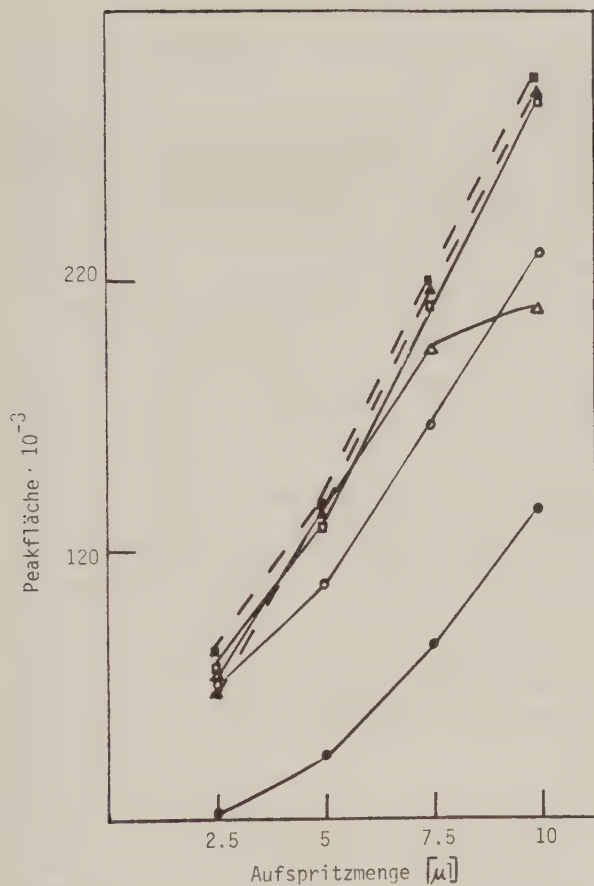


Abb. 27c

Bestimmung der Aminosäuren als o-Phthalaldehydderivate und Auftrennung über RP-18-Säule (Beckmann, ODS 5 μm)

Legende zu Abb. 27a,b,c

Auf die RP 18-Säule wurden unterschiedliche Mengen eines Biorad-Aminosäurestandardgemisches nach vorheriger Derivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd (2.2.19.3) injiziert. Die Aminosäuren wurden in einem Acetonitrilgradienten (3% - 60% Acetonitril) eluiert (2.2.19.3) und die Fluoreszenz (Ex 338 nm, Em 425 nm) gemessen. Die vom Integrator ausgedruckten Peakflächender Aminosäuren wurden gegen die aufgespritzte Menge aufgetragen.

|    |                                                                                   |   |    |                                                                                   |   |    |                                                                                   |   |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---|
| a) |  | D | b) |  | F | c) |  | S |
|    |  | G |    |  | L |    |  | K |
|    |  | E |    |  | Y |    |  | R |
|    |  | A |    |                                                                                   |   |    |  | V |
|    |                                                                                   |   |    |                                                                                   |   |    |  | I |
|    |                                                                                   |   |    |                                                                                   |   |    |  | M |

2.5  $\mu$ l Standard = 31.25 pMol /Aminosäure

matisch. Diese Aminosäure konnte erst nach 5-6 Standardaufspritzungen nachgewiesen werden, dann allerdings in reproduzierbaren Mengen. Wahrscheinlich mußte die verwendete Säule erst einen bestimmten Sättigungsgrad mit Lysinderivat erreicht haben.

### 3.7.2 Aminosäurezusammensetzung der radioaktiv markierten Phosphopeptide des Troponins

Da die Primärsequenz des Troponin T bekannt ist (Pearlstone et al., 1976), und die Peptidspaltung durch Trypsin spezifisch nach einem Lysyl- und Arginylrest erfolgt, kann man die isolierten Phosphopeptide aufgrund ihrer Aminosäureverhältnisse in die Sequenz des Troponin T einordnen. Die Peptide 1 und 2 (Abb. 25) konnten nicht einem bestimmten Bereich der Troponin T-Sequenz zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich bei beiden Peptiden doch noch um ein Peptidgemisch, da auch die Mengenbilanz, bestimmt aus der spezifischen Radioaktivität und aus der Aminosäureanalyse nicht übereinstimmen:

|                 |                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------|
| <u>Peptid 1</u> | berechnete Menge: 190 pMol (laut Radioaktivität)   |
|                 | gefundene Menge: 325 pMol (laut Aminosäureanalyse) |
| <u>Peptid 2</u> | berechnete Menge: 390 pMol (laut Radioaktivität)   |
|                 | gefundene Menge: 240 pMol (laut Aminosäureanalyse) |

Die Peptide 3 und 4 einerseits und das Peptid 5 andererseits zeigen große  $R_f$ -Wert-Unterschiede. Überraschenderweise besitzen sie fast dieselbe Aminosäurezusammensetzung (Tab. 3). Sie lassen sich folgender Primärsequenz zuordnen;

(-Lys-Lys-)-Ala-Leu-Ser-Ser-Met-Gly-Ala-Asn-Tyr-Ser-Ser-Tyr-Leu-Ala-Lys-(-Ala-Asp-Gln-Lys).

Tab. 3 Aminosäurezusammensetzung der  $^{32}\text{P}$ -markierten Peptide des Troponins T

| Aminosäure        | Abschnitt aus der Primärsequenz des Troponins | Peptid |        |        |
|-------------------|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|
|                   |                                               | 3      | 4(I)   | 5(II)  |
| D(N) <sup>+</sup> | 1                                             | 2.3(2) | 1.4(1) | 1.0(1) |
| E                 | -                                             | 2.1(2) | 1.9(2) | 1.4(1) |
| S                 | 4                                             | 4.8(5) | 3.6(4) | 4.4(4) |
| G                 | 1                                             | 2.5(3) | 1.9(2) | 1.1(1) |
| A                 | 3                                             | 3.4(3) | 4.2(4) | 2.9(3) |
| Y                 | 2                                             | 2.2(2) | 1.7(2) | 2.0(2) |
| M                 | 1                                             | 0.1(1) | 1.0(1) | 0.4(1) |
| L                 | 2                                             | 1.0(1) | 2.2(2) | 1.8(2) |
| K                 | 1                                             | 1.4(1) | 3.7(4) | 1.1(1) |

<sup>+</sup> Asparagin und Glutamin werden bei der Säurehydrolyse der Peptide in Asparaginsäure und Glutaminsäure umgesetzt.

Peptid 3 enthält ein Leucin weniger, dafür zuviel Glycin, Aspartat und Glutamat. Das deutet darauf hin, daß Peptid 3 noch als Peptidgemisch vorliegt oder im Laufe der Isolation verunreinigt wurde. Auch Peptid 4 und 5 sind wahrscheinlich leicht verunreinigt worden, da Peptid 4 einen etwas zu hohen Glyzingehalt und Peptid 5 einen zu hohen Glutamatgehalt aufweisen. Außerdem ist Peptid 4 unvollständig gespalten. Seine Sequenz ist um einige Aminosäuren verlängert (s. oben: in Klammern gesetzte Aminosäuren).

Durch Vergleich der chromatographischen Eigenschaften könnte man die Peptide 4 und 5 mit den vorher römisch I und II bezeichneten Peptiden gleichsetzen. Der große Unterschied in den  $R_f$ -Werten beruht auf den unterschiedlichen Phosphatgehalten von Peptid I und II. Peptid I enthält zwei Mol Phosphat pro Mol Peptid und Peptid II ein Mol Phosphat pro Mol Peptid. In Tab. 4 sind die charakteristischen Daten der beiden Phosphopeptide noch einmal zusammengefaßt. Abb. 28 zeigt die Aminosäureanalyse des Peptid II.

Die Analyseergebnisse, die mithilfe des automatischen Aminosäureanalysators (Ninhydrinderivate) gewonnen wurden, stimmen mit denen überein, die man mithilfe der HPLC ( $\alpha$ -Phthalaldehydderivate) erhalten hat. Wegen seiner leichten Oxidierbarkeit konnte Methionin teilweise nicht gefunden werden.

Nach dieser Analyse sind also zwei phosphorylierbare Seiten im Troponin T enthalten: das Ser 148 oder 149 und das Ser 156 oder 157. Im  $(P^1)$ -Holotroponinkomplex sind demnach dieselben Seiten für die Phosphorylasekinase zugänglich wie im isolierten Troponin T.

Als letzte Frage bleibt nun zu klären, wie die Phosphorylierung abläuft. Vielleicht muß erst eine Seite phosphoryliert werden, bevor die andere

Tab. 4 Eigenschaften der Phosphopeptide des Troponins

|                                                             | Peptid I (4) |         | Peptid II (5) |         |
|-------------------------------------------------------------|--------------|---------|---------------|---------|
| Phosphatgehalt                                              | 2            |         | 1             |         |
| Mol Pi/Mol Peptid                                           |              |         |               |         |
| R <sub>f</sub> -Werte auf Kiesel-<br>gel nano-HPTLC-Platten | 0.23         |         | 0.45          |         |
| R <sub>f</sub> -Werte auf Cel MN 300-<br>Platten            | 0.54         |         | 0.63          |         |
| Elution von der RP 18-<br>Säule bei X% Acetonitril          | 18           |         | 27            |         |
| Aminosäure                                                  | OPA          |         | Ninhydrin     |         |
| D                                                           | 1.4 (1)      | 1.2 (1) | 1.0 (1)       | 1.1 (1) |
| E                                                           | 1.9 (2)      | - -     | 1.4 (1)       | -       |
| S                                                           | 3.7 (4)      | 3.6 (4) | 4.4 (4)       | 3.6 (4) |
| G                                                           | 1.9 (2)      | 1.0 (1) | 1.1 (1)       | 1.0 (1) |
| A                                                           | 4.2 (4)      | 2.5 (3) | 2.9 (3)       | 2.5 (3) |
| Y                                                           | 1.7 (2)      | 1.9 (2) | 2.0 (2)       | 1.8 (2) |
| M                                                           | 1.0 (1)      | 0.2     | 0.4           | -       |
| L                                                           | 2.2 (2)      | 2.0 (2) | 2.0 (2)       | 1.8 (2) |
| K                                                           | 3.7 (4)      | 1.0 (1) | 1.1 (1)       | 1.0 (1) |

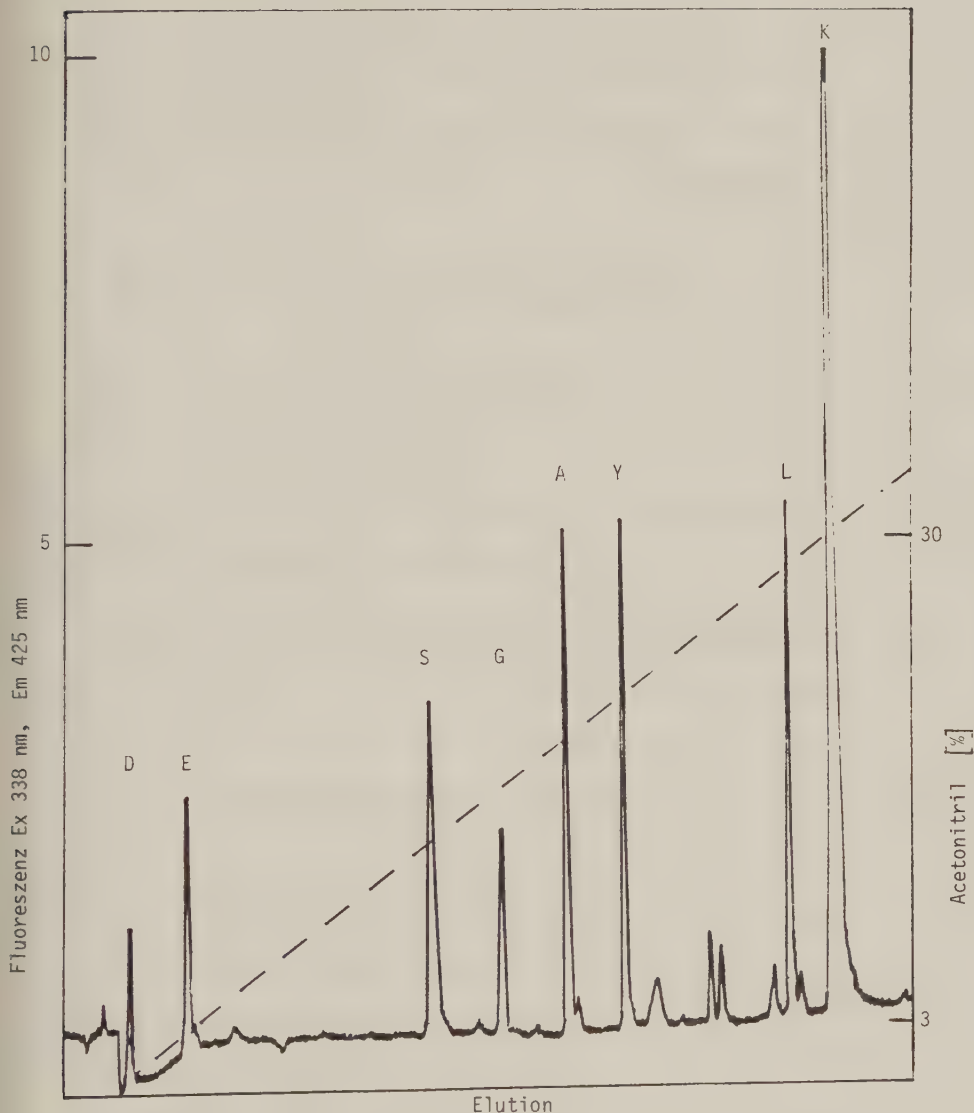


Abb. 28

Aminosäureanalyse des Peptid 5

Die Aminosäureanalyse wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Es wurden 100 pMol (nach der spezifischen Radioaktivität berechnet) hydrolysiertes und mit *o*-Phthalaldehyd derivatisiertes Phosphopeptid injiziert. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des Acetonitrilgradienten, die Buchstaben kennzeichnen die einzelnen Aminosäuren.

von der Phosphorylasekinase erreicht werden kann. Und warum kann man dann nur ein Mol Phosphat in das  $(P^1)$ -Troponin einbauen? Um die Fragen beantworten zu können, wurde die Phosphorylierungskinetik für beide Seiten bestimmt.

### 3.8 Bestimmung der Phosphorylierungskinetik für die beiden Phosphorylierungsseiten im $(P^1)$ -Troponin

Aus dem Phosphorylierungsansatz wurden zu bestimmten Zeiten Aliquote entnommen und die Phosphorylasekinase über Casein-Sepharose vom Phosphotroponin abgetrennt. Die Trennung über Casein-Sepharose ist analytisch ohne große Phosphatverluste machbar, da die zur Trennung benötigte Zeit nur sehr kurz ist. Anschließend wurden das radioaktiv markierte Troponin tryptisch verdaut, die Peptide auf Dünnschichtplatten chromatographiert, die radioaktiven Flecken quantitativ ausgekratzt und gezählt. Abb. 29 zeigt a) den Zeitverlauf der Holotroponinphosphorylierung, d.h. die Phosphorylierung beider Peptide und b) den Zeitverlauf der Phosphorylierung von Peptid I und II und die Summenkurve der Phosphorylierungskurven von Peptid I und II.

Man sieht deutlich, daß die Summenkurve in etwa dem Zeitverlauf der Holotroponinphosphorylierung entspricht. Das Peptid I wird zuerst phosphoryliert, das Peptid II später und auch langsamer. Während der Phosphateinbau in Peptid II erfolgt, wird das Peptid I teilweise dephosphoryliert. Auch aus Peptid II wird ein Teil des inkorporierten Phosphates wieder ausgebaut.

Nach den Ergebnissen aus der Aminosäureanalyse ist Peptid I doppeltphosphoryliert. Das bedeutet, daß zunächst beide Serine in einem Schritt phosphoryliert werden. Anschließend wird offenbar das Phosphat von einem der beiden Serine wieder abgespalten, wobei Peptid II mit einem Mol Phosphat entsteht.

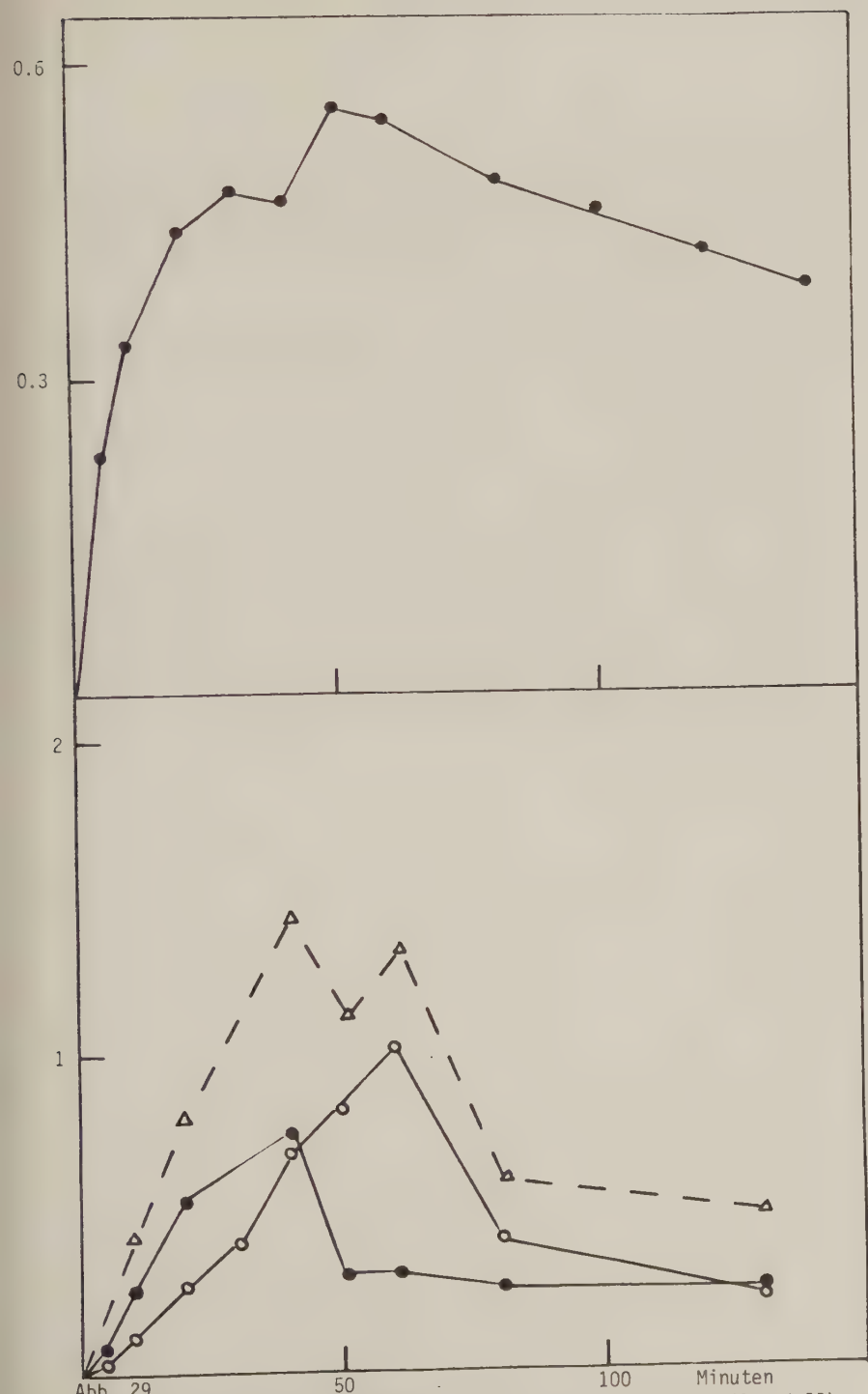


Abb. 29

Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der beiden Peptide (I und II)

Legende zu Abb. 29

Das obere Bild zeigt den Phosphorylierungsverlauf für das Troponin unter Standardbedingungen (2.2.12). Es wurden 1.5 mg Troponin und 0.15 mg Phosphorylasekinase eingesetzt. Aus demselben Ansatz wurden nach bestimmten Zeiten Aliquote ( $60 \mu\text{g}$ /Troponin) entnommen, um den Phosphorylierungsverlauf der Peptide I und II zu bestimmen (unteres Bild).

Um die Phosphorylierung zu stoppen, wurden die Aliquote im Verhältnis 1:1 mit 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.8 M LiCl, 10 mM NaF und 10 mM EDTA (pH 7.0) gemischt und auf Casein-Sepharose-Säulen (25 mg in blauen Pipettenspitzen) aufgetragen.

Aquibrierungspuffer: 35%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.8 M LiCl, 10 mM NaF und 10 mM EDTA (pH 7.0)

Elutionspuffer für Troponin: 20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.4 M LiCl, 10 mM NaF und 10 mM EDTA, Ausbeute: 98%

Elutionspuffer für Phosphorylasekinase: 0.4 M LiCl, Ausbeute 97%.

Das so von der Phosphorylasekinase getrennte radioaktiv markierte Troponin wurde TCA-gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und das Pellet in 0.5 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  aufgenommen. Das Protein wurde anschließend zu 90% tryptisch verdaut (2.2.17). Der gesamte Verdauungsansatz wurde nach Beendigung der Verdauung gefriergetrocknet, in 20% Ameisensäure aufgenommen und auf eine Cel 300 MN Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach der Chromatographie und Anfärbung der Peptidflecken mit Ninhydrinreagenz (2.2.15.1) wurden die radioaktiven Peptide im Dünnschichtscanner (Berthold; 2.2.14.2) lokalisiert, quantitativ ausgekratzt und in Dioxan im Scintillationszähler gezählt.

- Peptid I (4)
- Peptid II (5)
- Δ--Δ Summenkurve

Für die Dephosphorylierung sind Proteinphosphatasen verantwortlich,  
wie in früheren Versuchen nachgewiesen wurde.

#### 4. Diskussion

Moir et al., 1977 beschrieben die Phosphorylierung des aus dem Troponin-komplex isolierten Troponin T mit calmodulinabhängiger Phosphorylase-kinase. Zusätzlich zu dem Phosphat am N-terminalen Serinrest konnten sie zwei Mol Phosphat pro Mol Troponin T einbauen. Im Verlauf der Phosphorylierung treten keine Oszillationen auf.

Phosphoryliert man dagegen den ( $P^1$ ) Holotroponinkomplex mit Phosphorylase-kinase, so ist es unter den gewählten Bedingungen unmöglich, mehr als ein Mol Phosphat in die T-Untereinheit einzubauen. Außerdem beobachtet man im Verlauf der Phosphorylierung Oszillationen. Diese Schwankungen sind eindeutig auf das Zusammenwirken von Proteinphosphatase und Phosphorylasekinase zurückzuführen. Die Phosphataseaktivität wurde nachgewiesen:

- 1) durch die Dephosphorylierung des phosphorylierten Troponins,
- 2) durch die Phosphorylierung mit dem Thioanalogon des ATP's, dem  $ATP-\gamma-^{35}S$ .

Um den Proteinphosphatasen auch in vivo regulatorische Funktionen zuschreiben zu können, müßte man beweisen, daß es für Troponin spezifische Phosphatasen gibt. A. Djovkar konnte in seiner Doktorarbeit, 1979 zeigen, daß sich im Kaninchenskelettmuskel spezifische Phosphatasen in der Phosphorylasekinase, in der Troponin I-Untereinheit und in der Troponin T-Untereinheit befinden. Diese unterscheiden sich unter anderem in ihrer Substratspezifität,  $Mn^{2+}$ -Abhängigkeit und ihrer elektrophoretischen Mobilität.

Die Affinitätschromatographie von ( $P^1$ )-Troponin und Phosphorylasekinase ergab nur eine teilweise Abtrennung der Proteinphosphatasen. Die Phosphataseaktivität wurde durch Dephosphorylierung von Phosphorylase a getestet.

Die Phosphorylasekinase enthielt nur noch einen geringen Anteil an Phosphorylasephosphataseaktivität. Das Troponin spaltete sich nach der Chromatographie in zwei Fraktionen auf, von denen eine phosphorylasephosphatasefrei war. Die Phosphorylierung des 'phosphatasefreien' Troponins mit der gereinigten Phosphorylasekinase ergab einen Phosphorylierungsverlauf ohne Oszillationen. Die Phosphorylierung ungereinigten Troponins mit gereinigter Kinase - und umgekehrt - zeigte immer noch mehrphasisches Kurvenverhalten. Die Oszillationen waren aber deutlich abgeschwächt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sowohl die Phosphatasen, die mit dem Troponin isoliert werden, als auch diejenigen, die mit der Phosphorylasekinase isoliert werden, für die Dephosphorylierung des phosphorylierten Troponins verantwortlich sind.

Unterschieden sich die beiden Troponinfraktionen, die man nach der Affinitätschromatographie über Blaue Sepharose erhält nur durch ihren Gehalt an Proteinphosphatasen? Möglicherweise handelte es sich

- 1) um eine Phospho- und eine Dephosphoform,
- 2) um Monomer und Dimer oder
- 3) um Isoformen.

Die Phosphatbestimmungen ergaben für beide Troponinfraktionen einen Phosphatgehalt von einem Mol Phosphat pro Mol Troponin. Die Sedimentationskoeffizienten stimmten ebenfalls überein ( $S_{20,w} = 3.4S$  bzw.  $3.6S$ ).

Somit konnten die beiden ersten Möglichkeiten weitestgehend ausgeschlossen werden. Die dritte Möglichkeit wurde in dieser Arbeit nicht ausschöpfend behandelt, da sie zur Beschreibung der Troponinphosphorylierung nicht von Bedeutung war. Um dieses Problem zu klären, müßte von beiden Troponinfraktionen die Sequenz bestimmt werden, da sich Isoformen nur in einer

oder wenigen Aminosäuren unterscheiden.

Die Existenz von Isoformen im Skelettmuskel steht außer Frage. So sind z.B. bei Dhoot et al., 1979 die verschiedenen Formen des Skelettmuskel-troponins beschrieben. Das für diese Arbeit verwendete ( $P^1$ )-Troponin wurde aus Kaninchenskelettmuskel isoliert, der ein Gemisch aus rotem (ca. 20%) und weißem (ca. 80%) Muskel darstellt.

Die Analyse der Phosphorylierungsseiten des Troponins ließ keine Schlüsse auf das Vorhandensein von Isoformen zu.

Um die Phosphorylierungsseite(n) im Troponin zu bestimmen, wurden die Phosphopeptide isoliert und analysiert. Aufgrund ihrer Autophosphorylierung mußte die Phosphorylasekinase vom phosphorylierten ( $P^1$ )-Troponin abgetrennt werden. Dafür gab es mehrere Möglichkeiten:

- 1) erfolgte die Abtrennung der Phosphorylasekinase vom Troponin über Casein-Sepharose, also ohne SDS, so erhielt man nach der tryptischen Verdauung des Troponins zu über 90% nur zwei Phosphopeptide (I und II). Aber man erreichte nur eine sehr unvollständige Hemmung der Proteinphosphatase.
- 2) Die Proteine wurden SDS denaturiert und die Phosphorylasekinase durch Gelfiltration über Sephacryl S 300 in SDS abgetrennt. Bei dieser Methode treten zwar vermehrt unvollständige tryptische Spaltprodukte auf, aber die Proteinphosphatasen werden vollständig gehemmt.

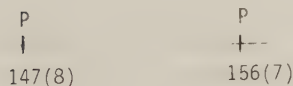
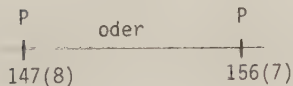
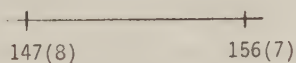
Nach der Verdauung durch Trypsin werden die Phosphopeptide durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie über eine "reversed phase" Säule mehrfach gereinigt. Die so isolierten und gereinigten Phosphopeptide wurden hydrolysiert und die Aminosäuren als o-Phthalaldehydderivate bestimmt. Da die Sequenz der Troponin T-Unterheit bekannt ist (Pearlstone et al., 1976), war es einfach, die isolierten Phosphopeptide aufgrund ihrer Aminosäuren-

verhältnisse in die Troponin T-Sequenz einzuordnen. Beide Phosphopeptide wiesen dieselbe Aminosäurezusammensetzung auf. Sie unterschieden sich nur durch ihren Phosphatgehalt. Peptid I enthält 2 Mol Phosphat/Mol Protein, Peptid II ein Mol Phosphat/Mol Protein.

Im ( $P^1$ )-Holotroponinkomplex sind dieselben Seiten (Ser 148 oder 149 und Ser 156 oder 157) für die Phosphorylasekinase zugänglich, wie in der T-Untereinheit die aus dem Komplex isoliert wurde.

Man kann in den ( $P^1$ )-Holotroponinkomplex nur maximal ein Mol Phosphat mit Phosphorylasekinase einbauen, obwohl zwei Phosphorylierungsseiten zur Verfügung stehen. Der Grund ist wahrscheinlich in der Dephosphorylierung durch Phosphatase zu suchen. Möglicherweise finden wir bei der Phosphorylierung ein Gemisch aus drei Phosphorylierungszuständen:

- a) keine Seite ist phosphoryliert
- b) eine Seite ist phosphoryliert
- c) beide Seiten sind phosphoryliert



Die durch den Blättchentest gemessenen Werte stellen nur einen Mittelwert über alle Phosphorylierungszustände dar. Überraschenderweise kann man bei der Phosphorylierung mit  $\text{ATP-}\gamma\text{-}^{35}\text{S}$  nur maximal ein Mol Thiophosphat pro Mol Troponin in die T-Untereinheit einbauen. Im Falle nur einer Phosphorylierungsseite im Troponin T würde man dieses Ergebnis erwarten. Da es aber im Troponin T zwei Phosphorylierungsseiten gibt, sollten aufgrund der Hemmung der Proteinphosphatasen zwei Mol Phosphat eingebaut werden. Möglicherweise gibt es im Troponin auch Proteinphosphatasen, die unter diesen Bedingungen noch aktiv sind und verhindern, daß mehr als ein Mol Phosphat inkorporiert werden kann.

Die Phosphorylierung der Seiten verlief nicht - wie erwartet - sequentiell ab, so daß zunächst eine Phosphorylierungsseite besetzt wurde und danach die Phosphorylierung der zweiten Seite erfolgte. Die Kinetikdaten ergaben, daß zunächst beide Seiten phosphoryliert werden und dann Phosphat sequentiell durch Proteinphosphatase abgebaut wird. Aufgrund sterischer Verhältnisse wäre diese Art der Phosphorylierung denkbar. Beide Serine liegen in einem nicht  $\alpha$ -helicalen Bereich des Troponins eng beieinander (Abb. 30). Möglicherweise findet die Phosphorylierung durch dasselbe katalytische Zentrum der Phosphorylasekinase statt, das sich nur geringfügig verschieben muß. In der Literatur ist ein solches Beispiel nicht bekannt. Bei der Phosphorylasekonvertierung, die durch Phosphorylasekinase katalysiert wird, geschieht die Phosphorylierung wie auch die Dephosphorylierung sequentiell (Hurd et al., 1966; Fischer, Heilmeyer und Hasch, 1971; Dombrádi et al., 1980, (Abb. 31). Dieses Verhalten ist allerdings auch verständlich, da sich die Phosphorylierungsseiten - räumlich weit getrennt gegenüberliegen (Madison et al., 1978). Sie sind zu weit voneinander entfernt, um von einem katalytischen Zentrum der Kinase gleichzeitig phosphoryliert zu werden.

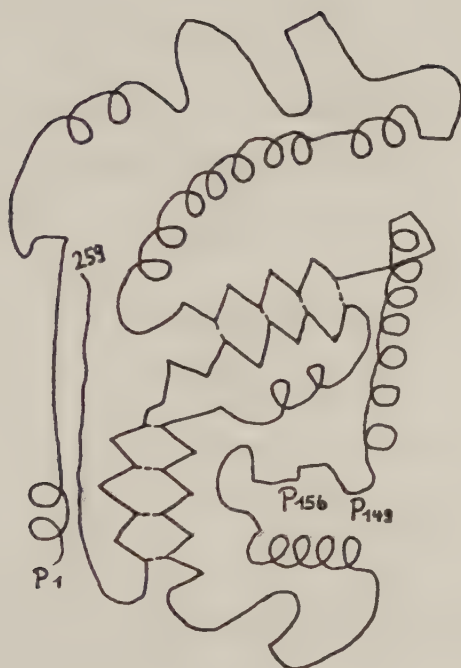


Abb. 30

Sekundärstruktur des Troponin T nach Pearlstone et al., 1976

Zur Erstellung dieses Schemas wurde die Methode von Chow und Fasman, 1974 verwendet.

P: Phosphat

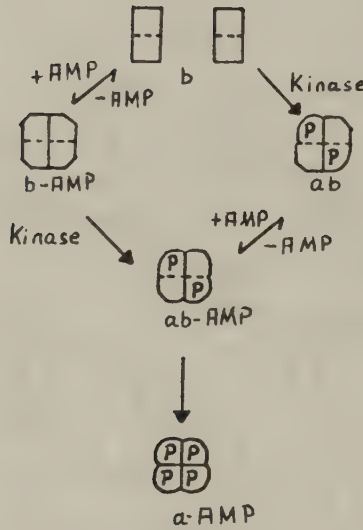


Abb. 31

Zustände bei der Phosphorylase b zu a - Konvertierung  
nach Dombrádi et. al., 1980

Die Quadrate, die Quadrate mit abgeflachten Ecken und die Halbkreise bedeuten unterschiedliche Polypeptidkonformationen. Die unterbrochene und die durchgezogene Linie zwischen den Untereinheiten weisen auf die beiden verschiedenen Bindetypen hin. Die Bezeichnung a, b und ab stehen für die jeweilige Form der Phosphorylase. P ist das durch die Phosphorylasekinase am Ser 14 inkorporierte Phosphat.

Daraus ergibt sich folgende mögliche Aufgabe der Proteinphosphatase während der Troponinphosphorylierung: die Doppelphosphorylierung wird durch die sterischen Verhältnisse sehr stark begünstigt. Eines der beiden Phosphate hat möglicherweise keine physiologische Bedeutung und wird von den Proteinphosphatasen entfernt.

Nach England, 1980 kommt der Phosphorylierung des Troponins keine besondere Bedeutung zu. Er begründet seine Theorie damit, daß die Phosphorylierungsraten für das Troponin zu gering sind im Vergleich zu anderen Phosphorylasekinasesubstraten.

Nach Pearlstone und Smillie, 1977; Perry, 1980 und Hitchcock et al., 1981 scheinen die Phosphorylierungsreaktionen mit der Bindung der Untereinheiten untereinander zu tun zu haben (Abb. 32). Troponin T ist mit der I- und der C-Untereinheit verbunden (Schaub und Perry, 1969; Ebashi et al., 1973; Hartshorne und Driezen, 1973). Nach Pearlstone und Smillie, 1978; Katayama, 1979; Ohtsuki, 1979 liegt die Troponin C-Bindestelle zwischen den Aminosäuren 159 und 259 des Troponin T. Für das Troponin I wurden sogar mehrere mögliche Bindestellen postuliert: a) an den Aminosäureresten 1-70 (Pearlstone und Smillie, 1980)

b) 159 - 259 (Katayama, 1979)

c) 152 - 209 (Pearlstone und Smillie, 1980).

Auch die Tropomyosinbinderegion liegt in der Nähe der Phosphorylierungsseiten (Aminosäurereste 71 bis 151) (Jackson et al., 1975; Pearlstone und Smillie, 1977).

Ein eindeutiger Beweis, daß die Phosphorylierung nicht nur in vitro, sondern auch in vivo stattfindet, ist die Isolation eines Troponins mit mehr als einem Mol Phosphat. Durch Hemmung von Phosphatasen während der gesamten Präparation, ist es gelungen, ein Troponin zu isolieren,



Abb. 32

Modell der Wechselwirkung zwischen den Proteinen des dünnen Filamentes nach Perry, 1980

- $P_{TK}$  = Phosphateinbau durch Troponinkinase
- $P_{PK}$  = Phosphateinbau durch Phosphorylasekinase
- $P_{CP}$  = Phosphateinbau durch cAMP-abhängige Proteinkinase
- T = Troponin T
- I = Troponin I
- C = Troponin C

das ca. 2 Mol Phosphat pro Mol Protein enthält (unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist noch nicht geklärt, an welche Untereinheit das zweite Phosphat gebunden ist. Aufgrund der Ergebnisse, die in dieser Arbeit dargelegt wurden, kann man vermuten, daß dieses Phosphat in der Troponin T-Untereinheit entweder an das Ser 148 oder an das Ser 156 gebunden ist. Dieser Nachweis würde die physiologische Bedeutung der Troponinphosphorylierung weiter bestätigen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Phosphorylierung des ( $P^1$ )-Holotroponinkomplexes mit calmodulinabhängiger Phosphorylasekinase untersucht.

Unter den gewählten Phosphorylierungsbedingungen wird das Phosphat zu 97% in die T-Untereinheit des ( $P^1$ )-Holotroponinkomplexes eingebaut. Maximal 1 Mol Phosphat wird durch die Phosphorylasekinase kovalent an das Troponin gebunden.

Im Laufe der Phosphorylierung treten Oszillationen auf. Diese beruhen auf dem Zusammenwirken von Phosphorylasekinase und Proteinphosphatase. Die Phosphataseaktivität wurde nachgewiesen:

- 1) durch die Dephosphorylierung phosphorylierten Troponins,
- 2) durch die Phosphorylierung mit ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  anstelle von ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ .

Nach tryptischer Verdauung des phosphorylierten ( $P^1$ )-Troponins erhält man zwei phosphorylierte Peptide (I und II). Diese Phosphopeptide wurden folgendermaßen isoliert und analysiert:

- 1) Reinigung der Phosphopeptide durch Gelfiltration über Sephadex G-25 und Hochdruckflüssigkeitschromatographie über RP-18.
- 2) Aminosäureanalyse mit einer neu entwickelten Methode. Die Aminosäuren wurden als o-Phthalaldehydderivate nachgewiesen.

Als Phosphorylierungsseiten konnten das Ser 148 oder 149 und das Ser 156 oder 157 identifiziert werden.

Die Peptide I und II besitzen dieselbe Aminosäurezusammensetzung. Sie unterscheiden sich durch ihren Phosphatgehalt. Peptid I, das 2 Mol Phosphat/Mol Peptid enthält, entsteht im Laufe der Troponinphosphorylierung zuerst, d.h. es werden zunächst beide Phosphorylierungsseiten gleichzeitig besetzt. Peptid II, das 1 Mol Phosphat/Mol Peptid enthält, entsteht später. Das bedeutet, daß eines der beiden inkorporierten Phosphate durch Proteinphosphatase ausgebaut wird.

## Abkürzungen

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| ADP   | Adenosindiphosphat                                            |
| AMP   | Adenosinmonophosphat                                          |
| ANSA  | 1-Amino-2-hydroxy-naphthalin-sulfonsäure-(4)                  |
| ATP   | Adenosintriphosphat                                           |
| BSA   | Rinderserumalbumin                                            |
| Ci    | Curie                                                         |
| DTE   | 1,4-Dithioerythrit                                            |
| EDTA  | Äthylendiamintetraessigsäure                                  |
| EGTA  | Äthylenglycol-bis(2-Aminoäthyläther)-N,N'-<br>tetraessigsäure |
| G-6-P | Glucose-6-Phosphat                                            |
| GP    | Natrium-2-Glycerinphosphat                                    |
| HPLC  | Hochdruckflüssigkeitschromatographie                          |
| IEF   | Isoelektrische Fokussierung                                   |
| ME    | 2-Mercaptoäthanol                                             |
| MgAc  | Magnesiumacetat                                               |
| OPA   | O-Phthalaldehyd                                               |
| PAGE  | Polyacrylamidgelelektrophorese                                |
| PEP   | Phosphoenolpyruvat                                            |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                                          |
| TCA   | Trichloressigsäure                                            |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin                            |
| Tris  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                               |

Literaturverzeichnis

- Bartlett, G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466
- Chow, P.Y. und Fasman, G.D. (1974) Biochem. 13, 222
- Cohen, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1
- Dhoot, G.K., Frearson, N., Perry, S.V. (1979) Exp. Cell Research 122, 339
- Dickneite, G. (1976) Diplomarbeit, Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum
- Djovkar, A. (1979) Dissertation, Abteilung für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
- Dobrovol'skij, A.B., Gusev, N.B., Martynov, A.V. und Severin, S.E. (1976) Biokhimiya 41, 1291
- Dombrádi, V., Hajdu, J., Bot, G., Friedrich, P. (1980) Biochem. 19, 2295
- Drabikowsky, W., Nowak, E., Barylko, B. und Drabowska, R. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 245
- Ebashi, S. (1961) Supp. Theor. Phys. 17, 37
- Ebashi, S. und Kodoma, A. (1965) J. Biochem. 58, 107
- Ebashi, S. und Endo, M. (1968) Prog. Biophys. Mol. Biol. 18, 123
- Ebashi, S., Endo, M., Ohtsuki, J. (1969) Q. Rev. Biophys. 2, 351
- Ebashi, S., Wakabayashi, T. und Ebashi, F. (1971) J. Biochem. (Tokyo) 69, 441
- Ebashi, S., Ohtsuki, J., Mihashi, K. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 235
- Eckstein, F. (1977), Biochim. Biophys. Acta 483, 1
- England, P.J. (1980) in: Recently discovered Systems of Enzyme Regulation by Reversible Phosphorylation, Chapter 7 Cohen (ed.) Elsevier/North Holland Biomedical Press
- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. und Adelstein, R.S. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2687

- Fahmy, A.R., Niederwieser, A., (1961) Helv. Chim. Acta 44, 2022  
Pataki, G., Brenner, M.
- Fischer, E.H., Krebs, E.G. (1958) J. Biol. Chem. 231, 65
- Fischer, E.H., Heilmeyer, jr. (1971) Curr. Top. in Cell Reg. Vol. 4, 211  
L.M.G., Haschke, R.H.
- Fiske, C.H. und Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 275
- Fulton, S.P. und Carlson, E.R. (1980) Am. Lab. 12, 55
- Glynn, J.M. und Chappel, J.B. (1964) Biochem. J. 90, 147
- Goody, R.S. und Eckstein, F. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 6252
- Greaser, M.L. und Gergely, J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4226
- Greaser, M.L. und Gergely, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2125
- Greaser, M.L., Yamaguchi, M., (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant.  
Brekke, C., Potter, J.D. und Biol. 37, 235  
Gergely, J.
- Gusev, N.B. und (1978) FEBS Proc. Meet. 12, 1329  
Dobrovol'skij, A.B.
- Hartshorne, D.J. und (1971) Biochim. Biophys. Acta 229, 698  
Pyun, H.Y.
- Hartshorne, D.J. und (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant.  
Driezen, P. Biol. 37, 225
- Haschke, R.H., Heilmeyer jr. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6657  
L.M.G., Meyer, F. und  
Fischer, E.H.
- Haselgrove, J.C. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant.  
Biol. 37, 341
- Heilmeyer, jr., L.M.G., (1981) Cold Spring Harbor Conf. on Cell  
Jahnke, U., Kilimann, M.W., Proliferation in Vol. 8: Protein Phosphory-  
Kohse, K.P. und Sperling, J.E. lation, 321
- Hitchcock, S.E., (1981) J. Biol. Chem. 147, 125  
Zimmermann, C.J., Smalley, C.
- Hurd, S.S., Teller, D., (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun.  
Fischer, E.H. 24, 79
- Huxley, H.E. (1972) in: The Structure and Function of  
Muscle, Vol. I Structure Part 1, G.H.  
Bourne (ed.), Acad. Press, New York und  
London
- Huxley, H.E. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant.  
Biol. 37, 361

- Iio, T., Mihashi, K. und Kondo, H. (1976) J. Biochem. (Tokyo) 79, 689
- Jackson, P., Amphlett, G.W. und Perry, S.V. (1975) Biochem. J. 151, 85
- Jahnke, U. und Heilmeyer, jr., L.M.G. (1980) Eur. J. Biochem. 111, 325
- Jaworek, D., Gruber, W. und Bergmeyer, H.U. (1974) in: Handbuch der enzymatischen Analyse (3. Aufl.) Band II, 2178, Verlag Chemie, Weinheim
- Jennissen, H.P. und Heilmeyer, jr., L.M.G. (1975) Biochem. 14, 754
- Katayama, E. (1979) J. Biochem. (Tokyo) 85, 1379
- Kilimann, M.W. (1978) Dissertation, Abt. für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
- Krebs, E.G., Kent, A.B. und Fischer, E.H. (1958) J. Biol. Chem. 231, 73
- Kumon, A. und Villar-Palasi, C. (1979) Biochim. Biophys. Acta 566, 305
- Lamprecht, W., Trautschold, J. (1974) in: Handbuch der enzymatischen Analyse (3. Aufl.) Band II H.U. Bergmeyer (Hrsg.), 2151, Verlag Chemie, Weinheim
- Lazdunski, M. und Delaye, M. (1967) Biochim. Biophys. Acta 140, 417
- Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., Gergely, J., Graberek, Z., Drabikowski, W. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5452
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
- Madsen, N.B., Kasvinsky, P.J., Fletterick, R.J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 9097
- Mans, R.J. und Novelli, G.D. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 94, 48
- Mc Cubbin, W.D., Mani, R.S. und Kay, C.M. (1974) Biochem. 13, 2689
- Meister, M.H. und Langau, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4961
- Moir, A.J.G., Wilkinson, J.M. und Perry, S.V. (1974) FEBS Letters 42, 253
- Moir, A.J.G., Cole, H.A. und Perry, S.V. (1977) Biochem. J. 161, 371

- Murray, C. und Kay, C.M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 237
- Ohtsuki, J. (1979) J. Biochem. (Tokyo) 86, 491
- Onishi, S., Maruyama, K. und Ebaski, S. (1975) J. Biochem. (Tokyo) 78, 73
- Parry, D.A.D. und Squire, J.M. (1973) J. Mol. Biol. 75, 33
- Pearlstone, J.R., Carpenter, M.R., Johnson, P. und Smillie, L.B. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 1902
- Pearlstone, J.R., Johnson, P., Carpenter, M.R. und Smillie, L.B. (1977) J. Biol. Chem. 252, 983
- Pearlstone, J.R. und Smillie, L.B. (1977) Can. J. Biochem. 55, 1032
- Pearlstone, J.R. und Smillie, L.B. (1978) Can. J. Biochem. 56, 521
- Pearlstone, J.R. und Smillie, L.B. (1980) Can. J. Biochem. 58, 649
- Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F. und Trayer, J.P. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 251
- Perry, S.V. und Cole, H.A. (1974) Biochem. J. 141, 733
- Perry, S.V., Cole, H.A., Morgan, M., Moir, A.J.G. und Pires, E. (1975) in: Proc. IX FEBS Meet., Proteins of Contractile Systems, Biro E.N.A. (ed.) Vol. 31, 163
- Perry, S.V. (1979) Biochem. Soc. Trans. 7, 593
- Perry, S.V. (1980) in: Muscle Contraction, 207 Ebaski, S., Maruyama, K. und Endo, M. (ed.) Japan Scientific Societies Press Tokyo und Springer Verlag
- Potter, J.D. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 436
- Potter, J.D. und Gergely, J. (1974) Biochem. 13, 2697
- Schaub, M. und Perry, S.V. (1969) Biochem. J. 115, 993
- Seamon, K.B., Hartshorne, D.J. und Bothner-By, A.A. (1977) Biochem. 16, 4039
- Seymour, J. und O'Brien, E.J. (1980) Nature (London) 283, 680
- Simons, S.S. jr. und Johnson, D.F. (1978) Anal. Biochem. 90, 705

- Sperling, J.E., Feldmann, K., (1979) Eur. J. Biochem. 101, 581  
Meyer, H., Jahnke, U. und  
Heilmeyer, jr., L.M.G.
- Stanley, L. (1981) J. Liq. Chrom. 4, 562
- Van Eerd, J.P. und (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun.  
Takahashi, K. 64, 122
- Villar-Palasi, C. und (1981) J. Biol. Chem. 256, 7409  
Kumon, A.
- Wakabayashi, T., Huxley, H.E., (1975) J. Mol. Biol. 93, 477  
Amos, L.A. und Klug, A.
- Weber, K. und (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406  
Osborn, M.
- Wilkinson, J.M., Perry, S.V., (1972) Biochem. J. 127, 215  
Cole, H.A. und Trayer, J.P.
- Wilkinson, J.M. und (1975) Biochem. J. 149, 493  
Grand, R.J.A.

## Lebenslauf

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 27.12.1952                      | geboren als Tochter der Eheleute Erich und Edith Sippel, geb. Berzen in Hagen                                                                                                                                                          |
| 1959 - 1963                     | Besuch der katholischen Volksschule Mühlenwert in Hagen-Haspe                                                                                                                                                                          |
| 1963 - 1971                     | Besuch des neusprachlichen Gymnasiums Hildegardis in Hagen                                                                                                                                                                             |
| Mai 1971                        | Abitur                                                                                                                                                                                                                                 |
| 1971 - 1973                     | Chemie-Studium an der Ruhr-Universität Bochum                                                                                                                                                                                          |
| 1973                            | Aufnahme des Biologie-Studiums an der Ruhr-Universität Bochum                                                                                                                                                                          |
| Oktober 1975                    | Diplomvorexamen                                                                                                                                                                                                                        |
| Oktober 1976                    | Eheschließung mit Ralph Jaquet                                                                                                                                                                                                         |
| April 1978                      | Diplomhauptexamen                                                                                                                                                                                                                      |
| März 1977 -<br>August 1978      | Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Mikroorganismen der Ruhr-Universität Bochum mit dem Titel: Analyse der Membranproteine von <i>Serratia marcescens</i> in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen und Genotyp |
| Februar 1979 -<br>November 1982 | Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum                                                                                                                         |





